

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor:
Prof. Dr. T. Gudermann

**Identifizierung von
cis- und trans-regulatorischen Elementen
der 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase/
Carbonylreduktase-Expression in
*Comamonas testosteroni***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

Dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von
Christina Schäfers
aus Paderborn

Marburg 2004

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 07. April 2005
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Prof. Dr. med. B. Maisch
Referent: Prof. Dr. E. Maser
Korreferent: Prof. Dr. J. Koolman

Es ist nicht genug zu wissen,
man muss es auch anwenden.
Es ist nicht genug zu wollen,
man muss es auch tun.

Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832)

1	EINLEITUNG.....	7
1.1	Struktur von Steroiden.....	7
1.2	Synthese von steroidalen Verbindungen.....	8
1.3	Vorkommen	9
1.3.1	Sterole.....	9
1.3.2	Vitamine	11
1.3.3	Gallensäuren.....	11
1.3.4	Steroidhormone	12
1.3.5	Steroid-Sapogenine	13
1.3.6	Steroidglykoside und andere natürliche Glykoside.....	14
1.3.7	Flavonoide.....	14
1.4	Steroidmetabolismus.....	15
1.4.1	Steroidabbau in Vertebraten.....	15
1.4.2	Mikrobielle Steroiddegradation.....	15
1.5	Transport und Bindung von Steroiden	18
1.6	<i>Comamonas testosteroni</i>	20
1.6.1	Beschreibung des Bakterienstammes	20
1.6.2	Vorkommen von <i>Comamonas testosteroni</i>	20
1.6.3	Nutzung steroidal Verbindungen als Kohlenstoffquelle	22
1.6.4	3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/ Carbonylreduktase (3 α -HSD/ CR) ...	22
1.7	Aufgabenstellung.....	24
2	MATERIAL UND METHODEN.....	25
2.1	Geräte	25
2.2	Chemikalien und Materialien	26
2.3	Bakterienstämme und Plasmide	28
2.3.1	Bakterienstämme.....	28
2.3.2	Plasmide	28
2.4	Medien und Medienzusätze	29
2.4.1	Medien.....	29
2.4.2	Zusätze und Antibiotika	30
2.5	Mikrobiologische Techniken	30
2.5.1	Sterilisation.....	30
2.5.2	Wachstumsbedingungen.....	30
2.5.3	Bestimmung der Zelldichte	30

2.6	Molekularbiologische Methoden.....	31
2.6.1	DNA-Präparation	31
2.6.2	Bestimmung der DNA-Konzentration	32
2.6.3	Restriktion von DNA	33
2.6.4	Elution von DNA-Fragmenten	33
2.6.5	Amplifikation von DNA mittels PCR-Technik.....	34
2.6.6	Dephosphorylierung von DNA	35
2.6.7	Ligation	35
2.6.8	Herstellung von kompetenten Zellen und Hitzeschock-Methode, Transformation, Klonierung von Plasmidvektoren.....	36
2.6.9	Isolierung von Proteinen	37
2.6.10	Proteinbestimmung.....	37
2.6.11	Agarosegelelektrophorese	38
2.6.12	Electrophoretic Mobility Shift Assay.....	39
2.6.12.1	Labeling von DNA	40
2.6.12.2	Southern Blot.....	41
2.6.12.3	DNA-DNA-Hybridisierung.....	41
2.6.12.4	Detektion	42
2.6.12.5	Gel-Shift-Elektrophorese	44
2.7	Biochemische Methoden	45
2.7.1	Bestimmung der Enzymaktivitäten der 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	45
3	ERGEBNISSE.....	46
3.1	Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)	46
3.2	Orientierender EMSA mit aus dem Verdau von p6 entstandenen DNA- Fragmenten und Gesamtprotein aus p6 (EMSA I)	48
3.3	Suche nach den Operatoren der 3α-Hydroxysteroid-dehydrogenase	50
3.3.1	Darstellung möglicher Operatorsequenzen	50
3.3.2	Vergleich der Sequenzen OP1 und OP2 mit den im EMSA I retardierten DNA-Fragmenten.....	52
3.3.3	DNA-Fragmente für folgende EMSA	54
3.3.4	EMSA II (PCR 5/ PCR 7 + Gesamtprotein von p6)	56
3.3.5	EMSA III (PCR 4 + Gesamtprotein von p6).....	58
3.4	Suche nach möglichen Repressorproteinen für die 3α- Hydroxysteroiddehydrogenase.....	61
3.4.1	Plasmide, die zur Gewinnung von Protein für nachfolgende EMSA generiert wurden.....	61
3.4.1.1	Plasmide, kloniert in pUC 18	61
3.4.1.2	Plasmide, kloniert in pK 18.....	62
3.4.2	Untersuchung von orf 4 auf Repressoraktivität bei der Regulation der 3 α - Hydroxysteroiddehydrogenase.....	64
3.4.2.1	EMSA IV (PCR 5 + Protein von pKAN10).....	65
3.4.2.2	EMSA V (PCR 1/ PCR 3 + Protein von pKAN10)	67

3.4.2.3	EMSA VI (PCR 6 + pK17)	69
3.4.2.4	EMSA VII (PCR 2 + Protein von pKCN2, pKAN10, p6NP1)	70
3.4.3	Untersuchung von orf 2 und orf 3 auf seine Repressoraktivität bei der Regulation der 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase	72
3.4.3.1	EMSA VIII (PCR5 + Protein p6/ Protein p6N4)	73
3.4.3.2	EMSA IX (PCR 1/ PCR 2/ PCR 3 + p6NP1)	76
3.5	Bestimmung der Aktivität der 3α-Hydroxysteroiddehydrogenase mit Hilfe der HPLC	78
4	DISKUSSION	84
4.1	Diskussion der vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit	84
4.1.1	Methodik	84
4.1.2	Diskussion zu den möglichen Operatorregionen der 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase	85
4.1.3	Diskussion zu den Ergebnissen der HPLC	88
4.1.4	Diskussion zu den möglichen Repressoren der 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase	90
4.2	Genregulation in Bakterien	93
4.2.1	allgemeine Regulation	93
4.2.2	Bakterielle Repressoren	94
4.2.3	Bakterielle Operatoren in Interaktion mit ihren Repressoren	96
4.2.4	DNA-Looping	98
4.2.5	Formen der DNA-Loopausbildung	99
4.3	Einsatzmöglichkeiten von <i>Comamonas testosteroni</i> in Medizin und Umwelttechnik	102
4.3.1	Umwelttechnik	102
4.3.2	Medizin	103
5	ZUSAMMENFASSUNG	105
6	ANHANG	107
6.1	Literaturverzeichnis	107
6.2	Abkürzungsverzeichnis	121
6.3	Publikationen	123
6.4	Lebenslauf	124
6.5	Akademische Lehrer	125
6.6	Danksagung	126
6.7	Ehrenwörtliche Erklärung	127

1 EINLEITUNG

1.1 Struktur von Steroiden

Bei den Steroiden handelt es sich um natürlich vorkommende, komplexe organische Verbindungen. Nach der systematisch-chemischen Nomenklatur leiten sich die Steroide von dem Cyclopentano-Perhydrophenanthren-Ringsystem ab, dem Gonan bzw. Steran, einem tetrazyklischen, gesättigten Kohlenwasserstoff, der 17 Kohlenstoff-Atome enthält. In der Regel sitzen noch zwei anguläre Methylgruppen (C-18, C-19) an C-10 und C-13 und eine Seitenkette an C-17.

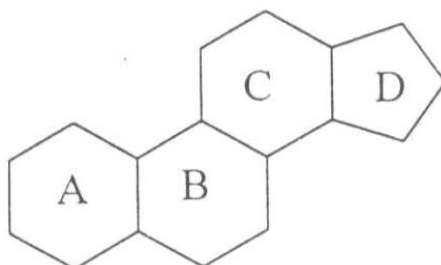


Abb. 1: Gonan

Die einzelnen Kohlenstoffatome werden international mit Ziffern, die Ringe mit den Buchstaben A bis D gekennzeichnet. Die Ringe B und C, sowie C und D sind bei allen natürlich vorkommenden Steroiden trans-verknüpft, zwischen den Ringen A und B kann die Verknüpfung unterschiedlich sein. Biochemisch leiten sich die Steroide vom Cholesterol ab bzw. von seinem zugrundeliegenden Kohlenstoff Cholestan (Abb. 2).

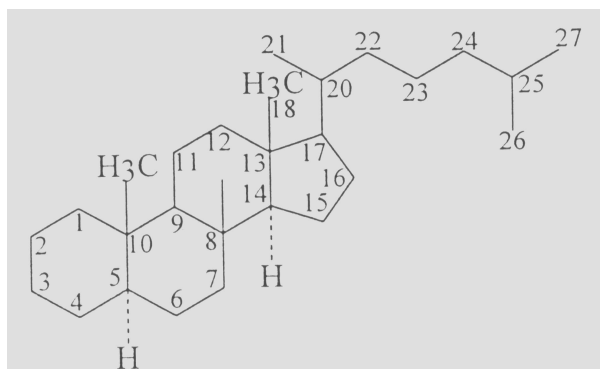


Abb. 2: Cholestan

1.2 Synthese von steroidalen Verbindungen

Im folgenden wird kurz auf die Synthese des Cholestan eingegangen. Ausgangssubstanz für alle Steroide ist das Isopren, welches durch eine Vielzahl von Schritten synthetisiert wird. Drei Moleküle Acetyl-CoA verbinden sich zu β -Hydroxy- β -methyl-glutarsäure, die nach der Reaktion noch eine CoA-Gruppe enthält. Nach deren Abspaltung und unter Umwandlung der Carboxyl- zur Alkoholgruppe entsteht die Schlüsselsubstanz der Isoprenoidsynthese, die Mevalonsäure. Nach einigen Umwandlungen der Mevalonsäure unter Verbrauch von ATP entsteht das Isopentenylpyrophosphat, das sogenannte „aktive Isopren“. Nach Umlagerung durch eine Isomerase in Dimethylallylpyrophosphat und Abspaltung des Pyrophosphat-Anions kann das verbleibende Carbonium-Kation eine Kettenreaktion einleiten, die zu der C15-Verbindung Farnesylpyrophosphat führt. Von hier kann die Kettenreaktion fortgesetzt werden (z.B. zu C20-Einheiten oder zum hochpolymeren Kautschuk) oder es erfolgt die Kopf-an-Kopf-Kondensation von zwei C15-Einheiten. Dabei entsteht Squalen ($C_{30}H_{50}$). Dieser Kohlenwasserstoff, den man zuerst aus Haifischleber isolierte, kommt auch bei Säugetieren in geringen Mengen vor. In der räumlichen Lagerung erfolgt durch die Hydroxylierung am späteren C-3 die Zyklisierung zum Steranskelett. Der Ringschluss erfolgt über das Epoxid zum Lanosterol. Das Cholesterol entsteht durch oxidative Entfernung von Methylgruppen, sowie Verschiebung der Doppelbindung im Ringsystem. Pflanzen und Bakterien können Squalen auch auf andere Weise zyklisieren. Insekten sind nicht in der Lage, das Sterangerüst aktiv aufzubauen und sind somit auf pflanzliche Steroide angewiesen, die sie nach Aufnahme ihren eigenen Bedürfnissen anpassen (Heftmann, 1975).

1.3 Vorkommen

Steroide und Steroid-ähnliche Verbindungen lassen sich überall in der Natur finden. Sie kommen in pflanzlichen, mikrobiellen und tierischen Organismen vor und übernehmen dort die unterschiedlichsten Aufgaben. Sie zeichnen sich durch eine ungewöhnlich lange Persistenz in der Umwelt aus, was ihnen auch die Bezeichnung chemische bzw. molekulare Fossilien einbrachte. Man kann sie aufgrund dieser Eigenschaft auch als biologische Markerverbindungen einsetzen (Mackenzie et al., 1982). Man teilt sie aufgrund ihrer Funktion und ihres Aufbaus in verschiedene Gruppen ein. Wichtige Vertreter bilden z.B. die Steroidhormone, die Gallensäuren und die Sterole, die auch teilweise als Sterine bezeichnet werden. Die Sterine und pflanzlichen Steroide sind durch eine alkoholische Hydroxylgruppe an C-3 gekennzeichnet.

1.3.1 Sterole

Das Sterin der Vertebraten ist das Cholesterin, das ubiquitär im Körper vorkommt und z.B. zusammen mit Phospholipiden am Membranaufbau beteiligt ist, sowie am Aufbau der Myelinscheiden. Erst 1932 stand die Strukturformel von Cholesterin fest, die Totalsynthese gelang 1951. Es ist vor allem im Gehirn und Rückenmark konzentriert. Der menschliche Körper enthält ca. 300g Cholesterin in freier Form oder als Fettsäureester, 1.4-3.3 g werden im menschlichen Blut gefunden. Obwohl es selbst keine nennenswerten physiologischen Aktivitäten besitzt, nimmt es als Ausgangsmaterial aller übrigen Steroide wie z.B. der Gallensäuren, der Nebennierenrindenhormone, der Steroidhormone der Keimdrüsen und des Vitamins D im tierischen Organismus eine zentrale Stellung im Steroidstoffwechsel ein. Außerdem spielt es eine pathologische Rolle bei der Genese der Arteriosklerose und bei dem Auftreten von Gallensteinen.

Weitere Sterine wurden auch bei Pflanzen und niederen Tieren gefunden. Je höher man in der Tierreihe aufsteigt, desto einheitlichere Steroidmuster werden beobachtet. Im Wollfett der Schafe findet man Lanosterin (Steroid des Wollfettes), das bei Tieren und

Pilzen als Zwischenprodukt der Cholesterinbiosynthese anfällt. Bei den Vertebraten sind neben dem Cholesterin als wichtigstem Vertreter noch weitere sogenannte Zoosterole zu finden, wie z.B. das von Darmbakterien gebildete Koprostanol.

Phytosterine (Phytosterole) sind Sterole aus Pflanzen und Mikroorganismen. Die Sterole aus niederen Pflanzen wie Algen und Pilzen werden auch teilweise noch als Mycosterine bezeichnet. Sie haben gegenüber den C-27 Zoosterinen eine Ergosteran-Reihe (C-28) oder zwei weitere Methylgruppen (Stigmasteran-Reihe, C-29) in der C-17-Seitenkette und meist noch weitere Doppelbindungen. Ergosterin (Ergosterol, 5,7,22-Ergostatrien-3 β -ol, Provitamin D₂), das erstmals aus Mutterkorn isoliert wurde (Tanret, 1989), ist als wichtigstes Mycosterin in vielen Algen, Pilzen, Flechten und fetten Ölen zu finden und ist das Hauptsterin der Hefe, aus der es leicht zu gewinnen ist. Stigmasterin (Stigmasterol, 5,22-Stigmastadien-3 β -ol) wurde ursprünglich aus der Calabar-Bohne isoliert, wird heute aber aus dem unverseiften Teil von Sojaöl gewonnen. Sitosterine sind in Getreide enthalten, β -Sitosterin (β -Sitosterol, Stigmast-5-en-3 β -ol) im Weizenkeimöl. Campesterin (Campesterol, 5-Ergosten-3 β -ol) kommt zusammen mit Sitosterin und Sigmasterin als eine der Hauptkomponenten in der Sterinfraktion mehrerer Pflanzen- und Saatöle vor und wurde in Mollusken gefunden. In Algen ist neben Ergosterin noch das Fucosterin (Fucosterol, 5,24(28)-Sigmastadien-3 β -ol) enthalten, das eine weitere Methylgruppe in der Seitenkette besitzt. Brassicasterin (Brassicasterol, 5,22-Ergostadien-3-ol) kommt relativ häufig in der Sterinfraktion von Rapssaat- und Senfsaatöl vor. Phytosterine sind zu 0.3% in Pflanzenölen zu finden und stellen bei einer Weltproduktion von 40 Mio. Tonnen Pflanzenöl (1982) ein Rohstoffpotential von etwa 120.000 Jahrestonnen dar. Natürliche Phytosterine können selbst als Gemische als Rohstoffe für die Herstellung von Steroidpharmaka genützt werden.

Sterole sind seit langem auch in fast allen Mikroorganismen nachgewiesen (Carr et al., 1970; Schubert et al., 1964). Als Vorgänger der Sterole gelten heute die in Bakterien membranstabilisierend wirkenden Hopanoide (Ourisson et al., 1987; Kannenberg et al., 1996).

1.3.2 Vitamine

Ein weiterer für den Menschen wichtiger Steroidabkömmling ist das sogenannte Vitamin D, wobei es sich eigentlich um eine Vitamingruppe handelt (z.B. Vitamin D₂, D₃ usw.). Man unterscheidet Calciferol (Vitamin D₂), das den aktiven Bestandteil von Vitamin D-Präparaten darstellt und Cholecalciferol (Vitamin D₃, auch Ergocalciferol), das beim Menschen etwas besser wirkt als D₂. Durch UV-Licht werden 5,7-Dihydrosterine (z.B. pflanzliches Ergosterin) im Organismus hauptsächlich in Prävitamin D umgewandelt, das thermisch durch eine sigmatrope Umlagerung in Vitamin D (Calciferol) überführt wird. Nach 25-Hydroxylierung in der Leber und 1-Hydroxylierung in der Niere entsteht als Vitamin D₃, die eigentlich aktive Form des Hormons, das sogenannte Vitamin-D-Hormon. Dieses bindet an verschiedene Rezeptoren und reguliert die Transkription zahlreicher Gene. Diese Vitamine sind lebensnotwendig für den Phosphat- und Calciumhaushalt, sowie für den Knochenstoffwechsel. Fischöle und Eigelb sind die besten Quellen für Vitamin D₃, in geringen Mengen findet es sich in Milch und Butter.

1.3.3 Gallensäuren

Bei den Gallensäuren handelt es sich um Abbauprodukte der Steroide. Sie besitzen in der C-17-Seitenkette eine Carboxylgruppe, die durch Oxidation in der Leber entsteht. Gallensäuren sind mit ihrem hydrophoben und dem hydrophilen Strukturanteil grenzflächenaktiv und zur Mizellenbildung befähigt. Sie spielen bei der Emulgierung und Verdauung von Fetten eine Rolle und erleichtern die Resorption vieler Arzneimittel. Sie aktivieren Lipasen, die wiederum eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Fetten spielen. Gallensäuren werden mit der Gallenflüssigkeit in den Darm abgegeben, pro Tag werden etwa 4 g Gallensäuren erzeugt. Bei Säugetieren kommen ausschließlich Cholsäurederivate vor. Ihre Synthese ist in der Leber lokalisiert, wobei die wichtigsten Vertreter die Taurin- und Glykolderivate der Cholsäure (3 α ,7 α ,12 α -Trihydroxy-5 β -cholan-24-säure), die Desoxycholsäure (3 α ,12 α -Dihydroxy-5 β -cholan-24-säure) und die Cheno-Desoxycholsäure (3 α ,7 α -Dihydroxy-5 β -

cholan-24-säure)- ein Isomer der Desoxycholsäure - sind. In verschiedenen Säugetierspezies lassen sich weitere Formen finden. In der Galle von Amphibien und Reptilien sind C₂₇- und C₂₈- Säuren enthalten. Die eigentlichen Gallensäuren liegen als Na⁺-Salze der gepaarten oder konjugierten Gallensäuren vor und werden aus letzteren durch alkalische Hydrolyse erhalten. Sie sind säureamidartig an Glycin als Glykocholsäure oder an Taurin als Taurocholsäure gebunden. Die stark sauren Tauroderivate treten häufiger auf, nur bei einigen pflanzenfressenden Säugetieren überwiegen die Glykoderivate.

1.3.4 Steroidhormone

Sehr wichtig für einen funktionierenden Stoffwechsel sind die Steroidhormone. Sie werden in verschiedenen Organen aus Cholesterin gebildet, wie z.B. der Nebennierenrinde, dem Ovar, dem Corpus luteum, der Plazenta und dem Hoden. Progesteron und die Hormone der Nebennierenrinde gehören zu den C₂₁-Steroiden. Sie leiten sich chemisch-systematisch vom Pregnan ab, einem Kohlenwasserstoff, der β -ständig eine Seitenkette von zwei C-Atomen trägt. Über weitere Umwandlungen entsteht hieraus das Progesteron, welches selbst den Ausgangsstoff für die überaus wichtigen Corticoide bildet. Durch verschiedene Oxygenasen (17-, 21-, 11-Oxygenase) erhält das Progesteron weitere Hydroxylgruppen. Über 17-Hydroxyprogesteron entsteht das Cortisol. Es übernimmt im Organismus verschiedene Aufgaben z.B. im Bereich der Immun- und Entzündungsmodulation und steht mit vielen anderen Stoffwechselkreisen (Knochenstoffwechsel, Zuckerhaushalt, etc.) in Verbindung.

Ein weiteres wichtiges Hormon der Nebennierenrinde ist das Aldosteron, das sich durch eine Aldehydfunktion in C₁₈ auszeichnet. Es reguliert als sogenanntes Mineralcorticoid den Wasserhaushalt des Organismus, es fördert die K⁺-Sekretion in der Niere und die N⁺-Rückresorption. Die Sexualhormone (Androgene, Östrogene, Gestagene) sind verantwortlich für die Ausbildung der Geschlechtsorgane, der sekundären Geschlechtsmerkmale und für die Geschlechtsfunktion des tierischen und menschlichen Organismus. Die Androgene werden gewöhnlich als männliche Geschlechtshormone bezeichnet. Die wichtigsten unter ihnen sind das Testosteron, das Androsteron, das

Androstendion und das Dihydrotestosteron. Sie sind unerlässlich bezogen auf ihre geschlechtsspezifische Wirkung wie z.B. Libido, Spermatogenese etc., aber auch bezogen auf ihre anabole Funktion wie z.B. Muskelmassenaufbau, Knochenstärke etc.. Im weiblichen Organismus werden täglich ca. 0.3 mg/Tag produziert, hier steuern sie z.B. die weibliche Sekundärbehaarung. Die Östrogene sind wichtige Hormone im weiblichen Organismus. Neben verschiedenen Aufgaben wie der Ausbildung der weiblichen sekundären Geschlechtsmerkmale steuern sie die erste Hälfte des weiblichen Menstruationszyklus. Gestagene sind besonders wichtig zur Ausbildung und Aufrechterhaltung einer möglichen Schwangerschaft, sie regulieren ebenfalls den weiblichen Zyklus.

Weiterhin kennt man bei Säugetieren Pheromone. Das Sexualpheromon des Ebers, ein Δ^{16} -Steroid, wird in den Hoden synthetisiert. Durch diesen Stoff wird die Kopulation der Schweine erleichtert. Das Keton findet sich auch in dem Achselhöhlenschweiß von Männern. Allerdings ist die Existenz von Pheromonen bei Menschen unbewiesen.

In Pflanzen findet man eine Reihe von Steroidhormonen, deren Aufgabe die Regulation der Sprossung und Blüte ist, wie z.B. Brassinosteroide und Curcubitacine (Russel, 1996; Jianming et al., 1996). Spinnen und Krebse (Arthropoden) bilden Ecdysteroide, die als eine Frühform der Steroide gelten. Ein wichtiger Vertreter dieser Gruppe ist das Ecdyson. Es steuert die Entwicklung von Insekten wie z.B. *Drosophila*, indem es regulierend auf verschiedene Netzwerke einwirkt (Huet et al., 1993).

1.3.5 Steroid-Sapogenine

Zu den wenigen tierischen Steroid-Sapogeninen, die aus der Hydrolyse von Saponinen entstehen können, zählen die Gifte der Seesterne. Die neutralen Steroid-Sapogenine sind oral ungiftig, bei parenteraler Applikation können sie Erythrozytenmembranen zerstören und die Blutgerinnung hemmen. Sie werden in Teilen Afrikas und Südasiens zum Fischfang eingesetzt. Auch in Pflanzen kann man Vertreter dieser Gruppe finden. So enthält die mexikanische Yamswurzel (*Dioscorea*) Diosgenin (Spirost-5-en-3 β -ol), das bei oraler Einnahme Brechreiz erzeugt. Diosgenin wird technisch als natürliches

Ausgangsprodukt für industrielle Partialsynthesen von in Antikonzeptionsmitteln eingesetzten Gestagenen gewonnen.

1.3.6 Steroidglykoside und andere natürliche Glykoside

Die Cardenolide, die in Form der herzwirksamen Glykoside starke Wirkung auf den Herzmuskel ausüben, regen in geringer Menge die Herztätigkeit an (positiv inotrop, negativ dromo- und chronotrop), in hoher Dosierung sind sie toxisch. Diese Substanzen kommen als Glykoside z.B. in verschiedenen Fingerhut-Arten (*Digitalis*), in afrikanischen *Strophantus*-Arten (*Apocynaceae*) oder im Oleander (*Nerium oleander*) vor. Ähnliche Aglyka findet man in Wehrsekreten mancher Käfer, die aus ihren Futterpflanzen stammen. Interessanterweise kommen sie auch als Inhaltsstoffe der Hautdrüsen von Kröten sowie in der Meerzwiebel (*Urginea (Scilla) maritima*) vor. Bereits seit dem Mittelalter ist die Giftigkeit des Roten Fingerhuts, *Digitalis purpurea*, bekannt, seit ca. 200 Jahren wird Digitalis zur Herztherapie eingesetzt. Diese Steroide verbessern den Wirkungsgrad der Herzarbeit und werden in Form der Glykoside zur Herzinsuffizienztherapie eingesetzt, obwohl die enge therapeutische Breite problematisch ist.

1.3.7 Flavonoide

Diese Gruppe gehört streng genommen nicht zu den Steroiden, sondern zu den Steroid-ähnlichen Verbindungen. Die Substanzen (z.B. Coumestrol und Genistein) werden von Pflanzen synthetisiert und sezerniert (Geuns, 1977). Sie übernehmen eine wichtige Rolle in der Regulation von Pflanzenwachstum und bieten eine Schutzfunktion gegen Insekten, Viren und Pilze. Sie können auch als Botenstoffe fungieren wie z.B. bei der Interaktion zwischen Leguminosen und Rhizobien (Redmond et al., 1986).

1.4 Steroidmetabolismus

Der Abbau von komplexen steroidal Verbindungen unterliegt unterschiedlichen Mechanismen. Hierbei muss zwischen Prokaryonten und Eukaryonten unterschieden werden.

1.4.1 Steroidabbau in Vertebraten

Bei Vertebraten ist die Inaktivierung der steroidal Verbindungen zum größten Teil in der Leber lokalisiert. Die Geschwindigkeit der Abbaureaktion bestimmt die Halbwertszeit der Steroide im Blutplasma, die in der Größenordnung von Stunden liegt. Der Steroidhormon-Level wird von Hydroxysteroid-Dehydrogenasen durch enzymatische Umwandlung zwischen den aktiven und inaktiven Metaboliten reguliert (Pawlowski et al., 1991; Stolz et al., 1991). Wichtige Reaktionen, die zur Inaktivierung der Steroidhormone und anderer Steroidverbindungen führen, sind die Reduktion von Doppelbindungen, die Reduktion der Oxo-Gruppen und die Bildung von Steroid-Konjugaten. Als Steroid-Konjugate werden bei Wirbeltieren Glucuronide und Sulfatester, bei Arthropoden Phosphatester gefunden. Die Steroide werden wasserlöslich und können über die Niere ausgeschieden werden. Lipophile Steroide werden über die Galle ausgeschieden. Zu einem vollständigen Abbau der Steroide unter Zerstörung der Ringstruktur sind die Tiere meistens nicht in der Lage.

1.4.2 Mikrobielle Steroiddegradation

Viele Mikroorganismen sind in der Lage, Transformationen am Sterangerüst und dessen Seitenketten vorzunehmen, was besonders für die pharmazeutische Industrie interessant ist (Vischer et Wettstein, 1958; Bortolini et al., 1997). Einige Mikroorganismen können im Boden vorhandene Steroide und Steroidanaloga als einzige Kohlenstoffquelle nutzen (Talalay et al., 1952). Diese Fähigkeit haben besonders Bodenbakterien, wie z.B. *Clostridien* und *Pseudomonaden* mit dem bekannten Vertreter *Comamonas testosteroni* (*C. testosteroni*) (Uwajima et al., 1978; MacDonald et al., 1979). Diese

Mikroorganismen können im Gegensatz zu den Vertebraten energiereiche steroidale Ringsysteme mit einer Vielzahl von Enzymen bis zur Bildung ringfreier Karbonsäuren und CO_2 vollständig abbauen (Schubert et al., 1968). Abbildung 3 zeigt ein vereinfachtes Schema des bakteriellen Steroidabbaus (Träger, 1977).

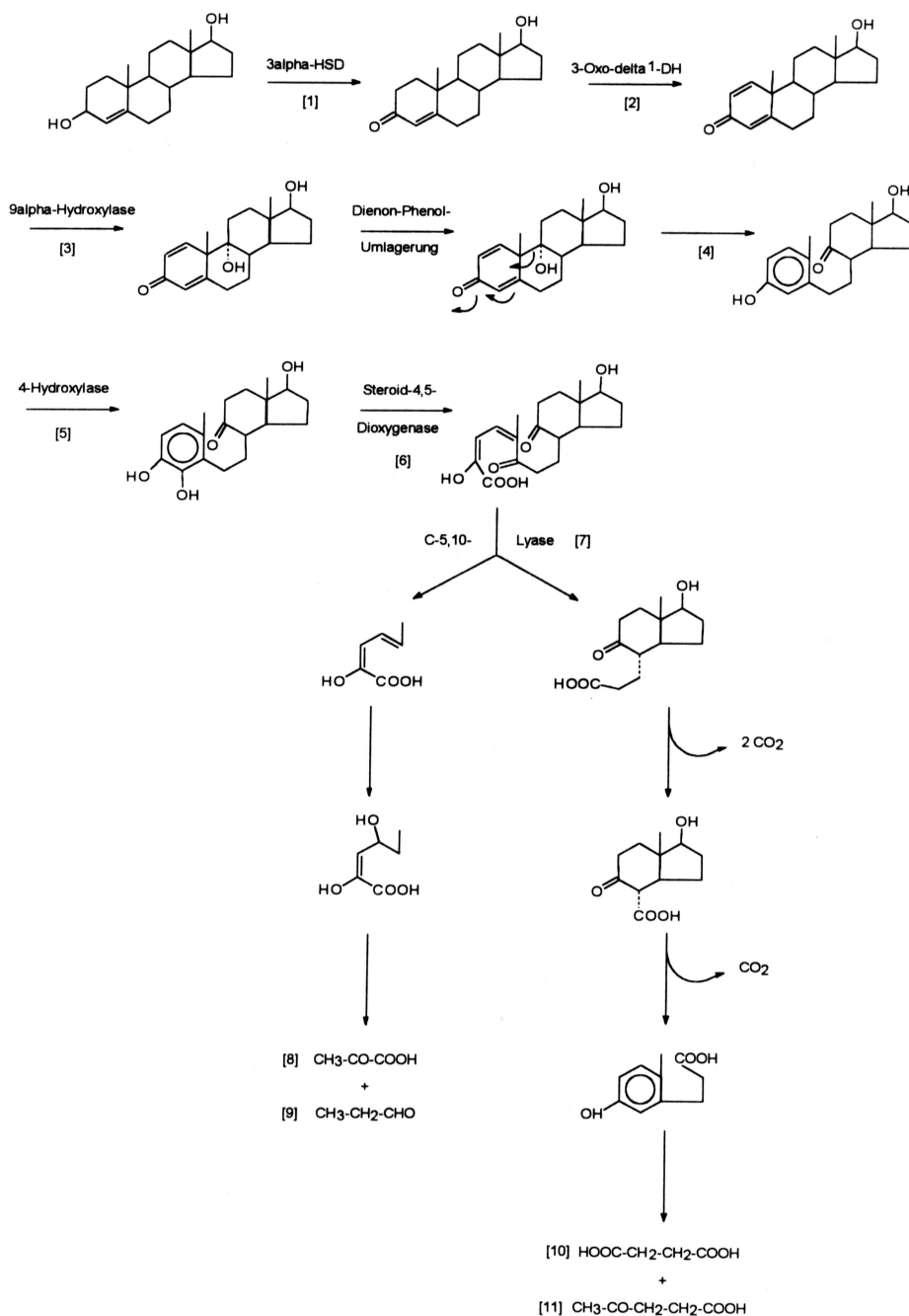


Abb. 3: Vereinfachtes Schema des bakteriellen Steroidabbaus. Verändert nach Träger, 1977

Zuerst erfolgt die Aromatisierung des A-Rings (Levy et Talalay, 1959) als Voraussetzung für die folgende Öffnung des B-Rings. Die 3α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase macht die Ringöffnung möglich, durch die vorhergehende Oxidation der 3-Hydroxylgruppe am A-Ring (Shikita et Talalay, 1979). Die Umwandlung von Hydroxyl- und Carbonylfunktion ist nikotinamidnukleotidabhängig. Im folgenden wird durch eine 3-Oxosteroid- Δ^1 -Dehydrogenase (Drobnic et al., 1993; Molnár et al., 1995) eine zusätzliche Doppelbindung in Ring A integriert. Nach einer spontanen Dienon-Phenol-Umlagerung fügt eine 9α -Hydroxylase eine Hydroxylgruppe an Position C₉ des Steroidgerüsts ein. Dies führt zur Öffnung des B-Ringes unter der Bildung von sogenannten Secosteroiden (Leppik et Sinden, 1987; Wang et Sih, 1963). Am nun aromatischen Ring A erfolgt eine weitere Hydroxylierung durch eine 4-Hydroxylase. Jetzt kann eine Steroid-4,5,-Dioxygenase die Spaltung des A-Rings des Sterans zu einem Diseco-Steroid katalysieren (Leppik, 1989; Gibson et al., 1966). Die Öffnung des A-Ringes in *meta*-Stellung zu den Hydroxylgruppen wird durch die Steroid-4,5-Dioxygenase erreicht, die zu den Exradiol-Dioxygenasen zählt. Die verbleibenden Reste am Ring A werden durch eine C-5,10-Lyase abgetrennt (Coulter et Talaly, 1968).

Falls wie in Abbildung 3 ein C₁₉-Steroid das Substrat darstellt, entstehen Brenztraubensäure und Propionaldehyd als Spaltprodukte aus dem Ring A. Diese werden zur Energiegewinnung in den Citratzyklus eingebracht. Die Spaltprodukte der Ringe B, C und D bilden Bernsteinsäure, Lävulinsäure und CO₂. Aus einem C₁₉-Steroid entstehen also vier Moleküle CO₂, zwei C₃-, eine C₄- und eine C₅-Säure (Leppik, 1989; Schubert et al. 1968).

Die Expression steroidumwandelnder Enzyme steht unter der Kontrolle der zu metabolisierenden Steroide (Wacker et al., 1965). Eine besondere Rolle im Abbau von Steroiden in Mikroorganismen spielen hierbei die Dioxygenasen, die eine oxidative Spaltung der Kohlenstoffringe katalysieren (Eltis et Bolin, 1996; Harayama et Rekik, 1989).

1.5 Transport und Bindung von Steroiden

Steroidale Verbindungen üben in eukaryontischen Organismen ihre Wirkung durch Interaktion mit bestimmten Genen im Zellkern aus. Die Steroide gehen eine Verbindung mit spezifischen intrazellulären Rezeptoren ein. Diese Hormon-Rezeptor-Komplexe werden in den Zellkern transportiert, wo sie mit dem nuklearen Chromatin in Kontakt treten können und die Genexpression beeinflussen können. Der Transport der steroidalen Verbindung ist ein wichtiger Vorgang, der bestimmten Regelmechanismen unterliegt (Abb. 4.)

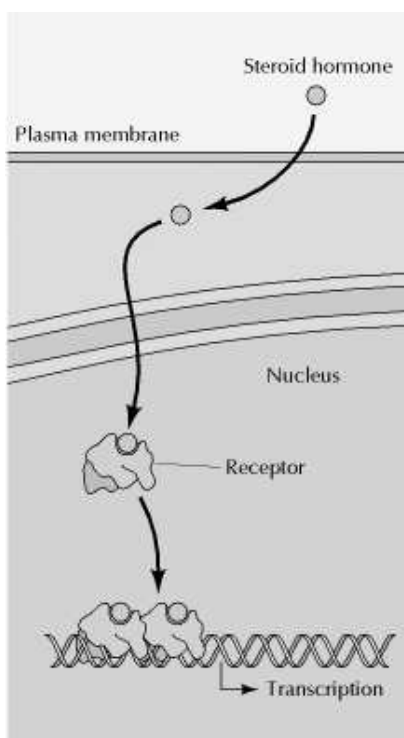


Abb. 4: Schema des Transports der Steroidhormone durch die Zelle und ihre Wirkung auf die Transkription. Nach Cooper et al., In: The Cell, 2000

In Prokaryonten ist über den Wirkmechanismus von steroidalen Verbindungen bisher wenig bekannt. Obwohl es sich um relativ große, starre und sehr hydrophobe Moleküle handelt, gelangen sie durch Diffusion durch die äußere Plasmamembran in das Periplasma von gramnegativen Bakterien. Die Diffusionsrate ist zweifach niedriger als bei der Diffusion durch normale biologische Membranen. Die äußere Membran von *C. testosteroni* besitzt eine erhöhte Permeabilität für Steroide als andere gramnegative Bakterien (Plesiat et Nikaido, 1992). Nach der Zellwandpassage gehen die Steroidhormone im periplasmatischen Raum eine Verbindung mit Proteinen ein, wobei

nur C19- und C21-Steroide transportiert und metabolisiert werden (Watanabe et Watanabe, 1974; Watanabe et Po, 1974). Für *C. testosteroni* wurde ein induzierbares Transportsystem für Steroide beschrieben, das in von diesem Organismus synthetisierten Membranvesikeln vorliegt (Watanabe et Po, 1974). Es besitzt die Eigenschaften eines energieabhängigen Transportsystems, in das eine Steroiddehydrogenase einbezogen ist (Watanabe et Po 1976; Lefebvre et al., 1976; Lefebvre et al., 1979) sowie ein Elektronentransportkanal (Lefebvre et al., 1976). Ein periplasmatisches Steroidbindepotein wurde identifiziert (Watanabe et al., 1979), sowie zwei membranassoziierte steroidbindende Proteine, die von der cytoplasmatischen Membran in den späteren Stadien der Vesikelpräparation freigegeben werden (Francis et Watanabe, 1979). Diese Bindeproteine werden durch das Wachstum von *C. testosteroni* auf Testosteron induziert und wechseln ihre Ladung (kationisch versus anionisch), sowie ihre Fähigkeit, Testosteron und Androstendion zu binden (Francis et Watanabe, 1979; Francis et Watanabe, 1980). Auch in verwandten Bakterienstämmen konnten Bindeproteine für Steroidhormone isoliert werden (Rowland, 1992). In den Steroidtransport in *C. testosteroni* sind die 3 β - und 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenasen involviert (Watanabe et Po, 1976; Lefebvre et al., 1976; Lefebvre et al., 1979). Sie sind auf der Außenseite der beschriebenen Membranvesikel lokalisiert und katalysieren die Umwandlung von Testosteron zu Androstendion. Unten gezeigt ist ein schematisches Modell der möglichen Interaktion zwischen steroidal Verbindungen und dem Genom von *C. testosteroni*, sowie der daraus folgenden Steuerung der Enzymexpression.

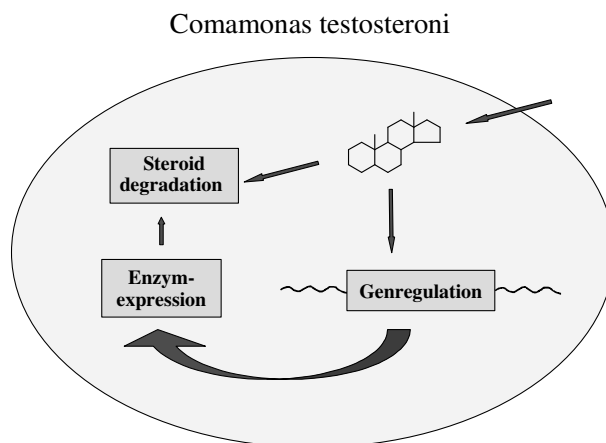


Abb. 5: Interaktionsmodell steroidal Verbindungen und dem Genom von *C. testosteroni*

1.6 *Comamonas testosteroni*

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Bakterienstamm *C. testosteroni* gehört dem Genus *Comamonas* an.

1.6.1 Beschreibung des Bakterienstammes

Die Comamonaden umfassen vier verschiedene Bakterienstämme: *Comamonas testosteroni*, *Comamonas acidovorans*, *Comamonas terrigena* und *Comamonas baltica*. Die Bakterienstämme gehören mit anderen Pseudomonaden, methylo trophen Bakterien und Essigsäurebakterien zur beta-Gruppe der Proteobakterien (Stackebrandt et al., 1988), genauer werden sie dem *Acidovorans*-Cluster der rRNA-Superfamilie III zugeordnet (Madigan et al., 1997). *C. testosteroni* wurde erstmalig aus verschmutzten Böden und Seeschlamm isoliert (Marcus et Talalay, 1956), damals aber noch als *Pseudomonas testosteroni* klassifiziert. Die Reklassifizierung zur Gruppe der *Comamonaden* erfolgte erst 1987 durch Tamaoka et al. In der Vergangenheit war die Einteilung der Bakterien zu ihren verschiedenen Genera oft problematisch, da nur die phänotypischen Merkmale zur Verfügung standen und damit keine ausreichende Unterscheidung stattfinden konnte. Zur genaueren Unterteilung der Bakterienstämme sind Methoden wie die Protein-Gel-Elektrophorese, die DNA-DNA- und DNA-rRNA-Hybridisierung oder immunologische Techniken unabdingbar. Die Gruppe der *Comamonaden* zeichnet sich durch verschiedene Merkmale aus: ihr Stoffwechselverhalten ist strikt aerob, nicht-fermentativ und chemoorganotrop (Willems et al., 1992). Die Morphologie läßt polar oder bipolar begeißelte, nicht-pigmentierte, leichtgebogene Stäbchen mit einer Grösse von 1µm-4µm erkennen.

1.6.2 Vorkommen von *Comamonas testosteroni*

Der Organismus *C. testosteroni* nutzt ein sehr weites Substratspektrum und ist in Böden sowie in natürlichen und industriellen Gewässern weit verbreitet. Die dominante Existenz dieser Mikroorganismen in stark verschmutzten und kontaminierten Gebieten

könnte ihre ökologische Relevanz bezüglich diverser Abbauprozesse zeigen (Garcia-Valdes et al., 1988). Sie wurden aber auch von klinischen Proben wie aus Blut, Eiter, Urin, Pharynxabstrichen, Augen, Nieren, Sputum, Faeces und perforierten Appendices isoliert (Gilardi, 1971; Ben-Tovim et al., 1974; De Vos et al., 1985; Gilardi, 1985). Ebenso wurden sie auf Materialien des klinischen Gebrauchs wie Beatmungstubi, Venenverweilkatheter und Harnwegskatheter gefunden. Die erste Isolierung aus klinischen Proben erfolgte 1956 (Galarneault et Leifson, 1956). *C. testosteroni* wird als opportunistisch pathogen eingestuft (Gilardi, 1985), so dass er auch als fakultativ humanpathogener Keim agieren kann. Infektionen treten besonders bei immunsupprimierten Patienten auf, die an konsumierenden Erkrankungen wie z.B. Lymphomen leiden (Sonnenwirth, 1970; Horowitz et al., 1990; Stonecipher et al., 1991; Castagnola et al., 1994). Es wurden auch Infektionen an Venenverweilkathetern von Patienten festgestellt, die an malignen Tumoren leiden (Le Moal, G., 2001). *C. testosteroni* wurde lange Zeit als nicht besonders humanpathogen eingestuft. Der Keim kann aber z.B. bei Perforation von Hohlorganen, schwerwiegende Infektionen im Gastrointestinaltrakt verursachen (Barbaro et al., 1987). Hierbei tritt der Keim meist im Rahmen einer Mischinfektion auf. Er konnte auch aus der menschlichen Bauchhöhle isoliert werden. Der ebenfalls zu den Pseudomonaden gehörende Keim *Pseudomonas aeruginosa* ist eine humanmedizinisch wichtige Art, die vielgestaltige Entzündungen auslöst, besonders solche der Harn- und Atemwege. Schon am Ende des vorigen Jahrhunderts wurde diese Art als Bakterium des blaugrünen Eiters (*Bacterium pyocyanum*) beschrieben. Sie scheiden Pigmente wie z.B. Pyocyanin aus und weisen häufige Antibiotikaresistenzen auf.

Neben seiner Rolle als opportunistisch pathogener Keim ist *C. testosteroni* auch Bestandteil der physiologischen menschlichen Darmflora (Barbaro, 1987). Seine speziellen Fähigkeiten in Bezug auf den Abbau xenobiotischer und endogener Steroidverbindungen lässt die Frage nach seiner Rolle im intestinalen Stoffwechsel laut werden. Der Beitrag von Darmbakterien wird oft vernachlässigt, wenn die Bioaktivierung oder Biodegradation von xenobiotischen Verbindungen betrachtet wird, obwohl ihre Rolle für verschiedene Verbindungen bewiesen ist (Kinouchi et al., 1993).

1.6.3 Nutzung steroidaler Verbindungen als Kohlenstoffquelle

Die Stämme zeigen ein gutes Wachstum auf Aminosäuren, Peptonen und einigen organischen Säuren (Holt et al., 1994), während sie nicht auf Glucose oder 2-Ketogluconat wachsen (Wettermark et al., 1979). Dies ist bedingt durch ein Fehlen der für den Glucosestoffwechsel wichtigen Enzyme, wie der Glucose-Dehydrogenase und der Glukokinase. Im Unterschied zu *Comamonas acidovorans* und *Comamonas baltica* können *C. testosteroni* und *Comamonas terrigena* auch nicht auf Mannitol und Fructose wachsen. Eine selektive Anreicherung dieser Bakterienstämme ergibt sich aus ihrer Fähigkeit, Sterole und aromatische Kohlenwasserstoffe als einzige Kohlenstoffquelle zu nutzen. So wächst *C. testosteroni* auf Testosteron (Talalay et al., 1952), Imidazolpropionat und Imidazolyl-Lactat (Coote et Hassal, 1973), p-Kresol (Dagley et Parel, 1957), Fumarat, Bromosuccinat, Anthranilat und Naphtalen (Garcia-Valdes et al., 1988) als einzigen Wachstumsquellen. Zusätzlich zu den Merkmalen, die den Steroidstoffwechsel betreffen, wurden verschiedene andere Aktivitäten im Bereich des Nicht-Steroid-Stoffwechsels beschrieben, z.B. der Abbau von aromatischen Hydrocarbonsäuren in verschiedenen Stämmen von *Comamonas testosteroni* (Sondossi et al., 1992; Barriault et Sylvestre, 1993; Busse et al., 1992; Braun Howland et al., 1993; Ahmad et al., 1990; Pettigrew et al., 1990; Hollender et al., 1994). Ebenso wurde aber gezeigt, dass diese Bakterien auch polychlorierte Biphenyle (PCB) und andere aromatische und alicyclische Kohlenwasserstoffe abbauen und verwerten können (Bergeron et al., 1994; Locher et al., 1989; Dagley et al. 1968).

1.6.4 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/ Carbonylreduktase (3 α -HSD/ CR)

Steroiddehydrogenasen sind essentiell bei der Mineralisierung von Steroiden, weil sie das Steroidgerüst für die Ringöffnung durch Dioxygenasen vorbereiten. In *C. testosteroni* konnten verschiedene steroidmetabolisierende Enzyme beschrieben und charakterisiert werden (Plesiat et al., 1991; Genti Raimondi et al., 1991; Abalain et al., 1993). Die 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase (3 α -HSD) initiiert als eines der ersten und zentralen Enzyme den steroidalen Abbauweg (Marcus et Talalay, 1956). Sie wurde in

Eukaryonten (Cheng et al., 1991) und in Prokaryonten wie z.B. *Clostridium perfringens* (MacDonald et al., 1976), *Eubacterium species* (Mallonee et al., 1995; MacDonald et al., 1979), *Pseudomonas putida* (Uwajima et al., 1978) und *C. testosteroni* (Boyer et al., 1965; Maser et al., 1992; Oppermann et Maser, 1996; Suzuki et al., 1993) identifiziert. In *C. testosteroni* wird sie nicht konstitutiv exprimiert, sondern nur nach Induktion durch ihr Substrat, wie z.B. Testosteron und Progesteron (Möbus et al., 1997; Oppermann et Maser, 1996; Marcus et Talalay, 1956). Die 3 α -HSD in *C. testosteroni* wurde in der zweidimensionalen Gelelektrophorese nach Testosteroninduktion identifiziert (Möbus et al., 1997). Das kodierende Gen der 3 α -HSD (*hsdA*) wurde auf einem 5257 bp *EcoRI*-Fragment auf chromosomaler DNA von *C. testosteroni* lokalisiert (Möbus et al., 1999). Nach Klonierung und Sequenzierung von *hsdA* und Überexpression der 3 α -HSD in *Escherichia coli* (*E. coli*) konnte in nachfolgender enzymatischer und biochemischer Charakterisierung das Genprodukt als 3 α -HSD identifiziert werden (Maser et al. 2000, Möbus et al. 1998). Im Vergleich mit dem aus *C. testosteroni* gereinigtem Wildtyp-Enzym zeigte auch die rekombinante 3 α -HSD die für den Wildtyp beschriebenen Reaktionen wie die Oxidoreduktion am C3-Atom von verschiedenen steroidalen Verbindungen und die Reduktion von nicht-steroidalen Carbonylverbindungen. Aufgrund der sehr variablen Substrate wird dieses Enzym vollständig 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase/ Carbonylreduktase (3 α -HSD/ CR) genannt. Durch seine Beteiligung am Abbau von toxischen Substanzen trägt es auch zum Schutz von *C. testosteroni* bei (Oppermann et al., 1996). Seine Induzierbarkeit erhöht auch die Resistenz von *C. testosteroni* gegenüber toxischen Substanzen wie z.B. der Fusidinsäure und dem Insektizid NKI 42255 (Oppermann et al., 1996). *hsdA* ist 774 bp lang und die daraus abzuleitende Sequenz von 258 Aminosäuren entspricht einer Molekularmasse von ca. 26.4 kDa. Vergleichende Analysen mit anderen Enzymen ergaben, dass die 3 α -HSD/ CR ein neues Mitglied der kurzkettigen Dehydrogenasen/ Reduktasen (short-chain dehydrogenase/ reductase (SDR) superfamily) ist (Möbus et Maser, 1996). Bisher konnten in der Familie der SDR nur tetramerische Enzyme indentifiziert werden. Mit Hilfe chromatographischer Reinigung konnte das Enzym als Dimer mit einem Gewicht von 49.4 kDa eluiert werden (Maser et al., 2000).

1.7 Aufgabenstellung

Die Fähigkeit zahlreicher Mikroorganismen, Steroide und ähnliche Verbindungen als Kohlenstoffquelle im Boden zu nutzen, ist schon lange bekannt. Interessanterweise steht die Expression der katalysierenden Enzyme und exprimierten Transport- und Bindeproteine unter der Kontrolle der Substrate selbst. Es ist unklar, ob diese steroidabhängige Induktion bei Mikroorganismen auf genetischer Ebene über einen Regulationsmechanismus verläuft, der den Signalwirkungen von Steroiden bei Eukaryonten entspricht. Innerhalb des Sonderforschungsbereich 395 der Philipps-Universität Marburg beschäftigt sich die Arbeitsgruppe unter Prof. Dr. E. Maser im Rahmen des Teilprojektes B8 unter anderem mit der Thematik „Molekulare Regulation der Verwertung von Bodensteroiden als Kohlenstoffquelle durch *Comamonas testosteroni*“. Ziel der geplanten Untersuchungen ist die Aufklärung der Signaltransduktionskette, die zur Expression steroidmetabolisierender Enzyme führt. In Vorarbeiten wurde neben verschiedenen Proteinen, die am Steroidabbau beteiligt sind, das steroidmetabolisierende Enzym, die 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3 α -HSD), erkannt. Die 3 α -HSD gilt als Initiator des steroidalen Ringabbaus, da durch Steroiddehydrogenasen das Steroidgerüst für die Ringöffnung vorbereitet wird. So wurde die 3 α -HSD aus dem Bodenbakterium *C. testosteroni* als Modell für intensiviertere Untersuchungen zu den Regulationsmechanismen dieser induzierbaren Enzyme gewählt. In Vorarbeiten zu dieser Arbeit wurde beim Screening einer *C. testosteroni* Gen-Bank mit einer homologen Oligonukleotidsonde für das 3 α -HSD-Gen im Southern-Blot ein hybridisierendes 5275 bp *Eco*RI-Fragment erkannt, kloniert und sequenziert. Neben der Erstellung der Primärstruktur der 3 α -HSD auf Basis der Basensequenz des 3 α -HSD-Gens wurde das Fragment in den Vektor pUC18 kloniert und in *E.coli* transformiert. In den transformierten Zellen konnte die Expression der 3 α -HSD in *E.coli* spezifisch nachgewiesen werden. Das klonierte Fragment enthält neben der Genssequenz der 3 α -HSD zwei weitere enzymcodierende Gene und vier offene Leserahmen. Ziel meiner Arbeit bestand in der Identifizierung von cis- und trans-regulatorischen Elementen der 3 α -HSD. Dazu wurden sowohl Aktivitätsmessungen mit der Hochdruckflüssigkeitschromatographie, sowie molekularbiologische Methoden wie Southernblots, Klonierungen, Mutationsstudien und Bandshift Assays durchgeführt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Geräte

Folgende Geräte wurden verwendet:

Elektrophoresen:

Geltrockner Slab Gel Dryer SGD 2000 (Savant, Holbrook, USA); Horizontale Submersapparaturen für die Agarosegelelektrophorese (Institutswerkstatt, Marburg, D); Polyacrylamidgelapparatur (Institutswerkstatt, Marburg, D)

Extinktionsmessungen:

Spektralphotometer DU^R-62 Spectrophotometer (Beckmann, München, D)

HPLC:

HPLC-Anlage Merck-Hitachi L6220 (Merck, Darmstadt, D)

Hybridisierung:

Hybridisierungsofen Hybaid Mini Oven (MWG-Biotech, Ebersberg, D)
Hybridisierungsröhrchen Hybaid HB-OV-BM (MWG-Biotech, Ebersberg, D)

PCR:

Thermocycler Hybaid Omn-E (MWG-Biotech, Ebersberg, D)

Photo-Anlage:

Image Master (Pharmacia Biotech, Freiburg, D)

Transformation:

E. coli Pulser (Bio-Rad, München, D)

Zentrifugation:

Eppendorf Zentrifuge 3200 (Eppendorf, Hamburg, D)
Heraeus Sepatech Biofuge 13 (Heraeus, Osterode. D)

Zellzüchtung:

Schüttelinkubator Rosi 1000TM (Thermolyne, Smithfield, AUS)

Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg, D)

2.2 Chemikalien und Materialien

Folgende Substanzen und Kits wurden von den aufgeführten Firmen bezogen:

AppliChem (Darmstadt, D)

Agar

Amersham Life Science (Ohio, USA)

Agarose

Amersham (Braunschweig,D)

Hybond N⁺- Nylonmembran, [γ^{32} p-]ATP

BioLab (Beverly Maryland, USA)

Vent-proof-reading Polymerase, *Taq*-Polymerase, 1 kb-Marker, Molekularbiologische Enzyme (Restriktionsenzyme, Ligationsenzyme)

Biometra (Göttingen, D)

Whatman 3MM Papier, Ethidiumbromid

Gibco BRL (New York, USA)

Low-melting-Agarose

Kodak (Rochester, USA)

Autoradiographiefilme

E. Merck (Darmstadt, D)

Standard I Nährbouillon, Agar, Maleinsäure, Calciumchlorid-Lösung, Serva Electrophoresis Dialysierschlauch Visking® und Servapor®

MBI (Heidelberg, D)

Molekularbiologische Enzyme (Restriktionsenzyme, Ligationsenzyme)

MWG (Ebersberg, D)

Oligonukleotide

Pharmacia Biotech (Freiburg, D)

Agarose NA

Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D)

NBT, X-Phosphat, Blocking Reagenz, DNA-Längenstandard II DIG, Anti-Digoxigenin-Antikörper-AP (Fab-Fragmente), CSPD®, Restriktionsenzyme, DNA-5'-Endlabeling Kit

Sigma (Deisenhofen, D)

Acrylamid-Lösung, TEMED

Qiagen (Hilden, D)

Plasmid Midi/Maxi Kit, QiaFilter

Die nicht gesondert aufgeführten Chemikalien und Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen: Merck (Darmstadt), Novagen (Madison, USA), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen).

2.3 Bakterienstämme und Plasmide

2.3.1 Bakterienstämme

Escherichia coli HB101 (Promega) diente als Wirtstamm für rekombinante pK18- und pUC18/19-Plasmide (pK18: CIBA-Geigy AG, Pridmore, 1987; pUC18: Amersham Pharmacia Biotech). Weiterhin wurde Material von *Comamonas testosteroni* ATCC 11996 (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen) verwendet.

2.3.2 Plasmide

Plasmide sind zirkuläre extrachromosomale DNA-Elemente, die natürlicherweise in Bakterien und einigen anderen Organismen vorkommen. In veränderter Form werden Plasmide als Klonierungsvektoren eingesetzt.

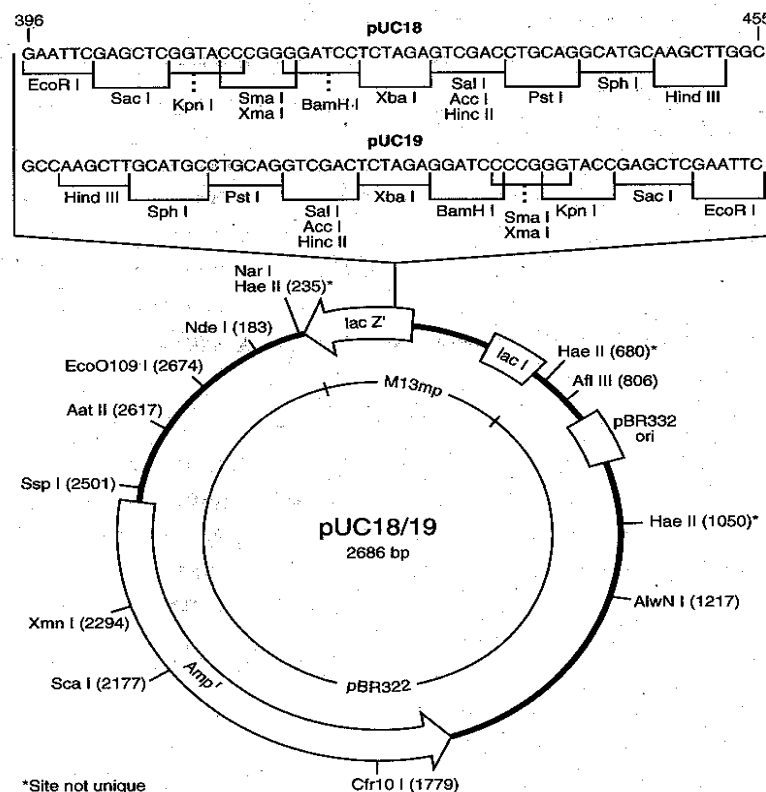


Abb. 6: Restriktionskarte von pUC18/19 (Ampicillinresistenz, *lacZ*-Promotor, ori)

Der pUC18/19-Vektor ist ein „high copy number“-Vektor für *E.coli*. Er ist 2686 bp groß und besitzt eine Antibiotikaresistenz gegen Ampicillin. Die Anzahl der kopierten Plasmide beläuft sich bei diesem Vektor auf ca. 80-120 pro Zelle. Außerdem enthält er den *lacZ*-Promotor. Eine Restriktionskarte des Vektors zeigt Abbildung 6.

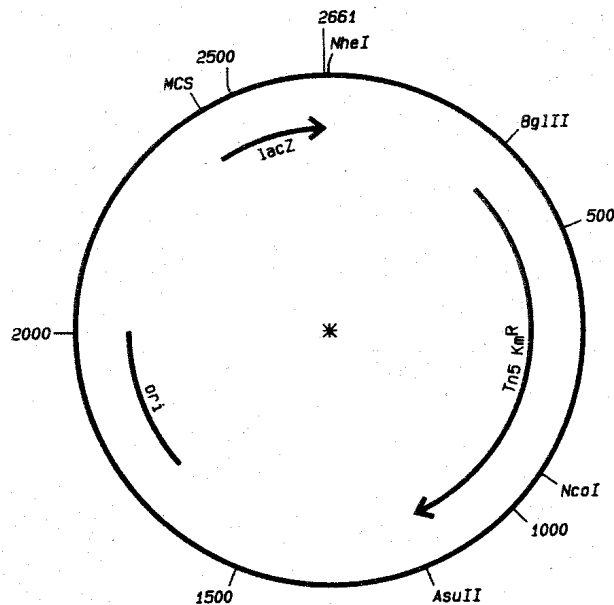


Abb.7: Restriktionskarte von pK18 (Kanamycinresistenz, *lacZ*-Promotor, ori)

Der pK18 Vektor (Pridmore, 1987) enthält statt dessen eine Kanamycinresistenz. Er besteht aus Teilen des pUC18/19-Vektors (238-1565 bp; Yanisch-Perron et al., 1985) und des pBRNeo-Vektors (1330 bp; Southern et Berg, 1982). Eine Restriktionskarte dieses Vektors zeigt Abbildung 7.

2.4 Medien und Medienzusätze

2.4.1 Medien

Die Standard-I-Nährbouillon wurde als Vollmedium verwendet, wobei jeweils 25g pro Liter Wasser eingewogen wurden. Für feste Medien wurden zusätzlich vor dem Autoklavieren 15g Agar eingewogen.

Standard-I-Nährbouillon:

2.5% (w/v) in H₂O

2.4.2 Zusätze und Antibiotika

Antibiotika wurden als konzentrierte Stammlösungen (Ampicillin 100 mg/ml, Kanamycin 30 mg/ml) in Wasser angesetzt und sterilfiltriert. Die Substanzen wurden anschließend den autoklavierten und auf 70°C abgekühlten festen oder flüssigen Medien zugesetzt. Die verwendeten Standardkonzentrationen waren folgende:

Ampicillin	60-80µg/ml
Kanamycin	30µg/ml

2.5 Mikrobiologische Techniken

2.5.1 Sterilisation

Zur Sterilisation wurden sämtliche Medien, Puffer und Materialien für molekulargenetische Arbeiten 20 Minuten bei 121°C und 1 kg/cm² Überdruck autoklaviert. Thermolabile Substanzen wurden sterilfiltriert. Glaswaren wurden mindestens 3 Stunden bei 140 °C hitzesterilisiert.

2.5.2 Wachstumsbedingungen

Die aeroben Bakterienkulturen wurden gut durchlüftet und bei 37°C inkubiert. Für Flüssigkulturen wurden Erlenmeyerkolben verwendet, die in einem Schüttelinkubator bei ca. 180 rpm inkubiert wurden.

2.5.3 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte einer Bakterienkultur wurde durch Messung der optischen Dichte bei 595 nm bestimmt.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 DNA-Präparation

Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde je nach Bedarf nach dem Protokoll der Firma Qiagen (Hilden) aus 50 ml-Kulturansätzen mit dem Qiagen Tip-100 Kit isoliert:

1. Die über Nacht im Schüttelinkubator inkubierten 50 ml Kulturen wurden 10 min bei 3500 rpm abzentrifugiert
2. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 4 ml Puffer 1 vollständig resuspendiert.
3. Nach Zugabe von 4 ml Puffer 2 zur Proteindenaturierung wurden die Proben 5 min bei Zimmertemperatur unter Schütteln inkubiert.
4. Danach wurden 4 ml Puffer 3 zugegeben und die Proben nach kurzem Schütteln 15 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden bei 3500 rpm 10 min zentrifugiert.
5. Inzwischen wurden die Qiagen-Tips mit je 3 ml Equilibrierungspuffer vorbereitet (Puffer QBT, Qiagen Plasmid Purification Handbook, Qiagen, Hilden)
6. Es wurden Filter aus Whatman 3MM Papier hergestellt, die auf die Tips gesetzt wurden.
7. Als nächstes wurde die Lösung durch den Filter gegossen. Dabei blieben die Zellreste im Filter, während das Plasmid in das jeweilige Tip gelangte. Die Röhrchen wurden 2x mit je 10 ml Waschpuffer gewaschen (Puffer QC).
9. Am Ende wurde die DNA wie folgt präzipitiert:
Es wurden je 5 ml Isopropanol in andere Röhrchen pipettiert und die Tips auf diese umgesetzt.
10. Es wurden je 5 ml Elutionspuffer hinzugefügt (Puffer QF). Nach dem Vermischen wurden die Proben bei 3500 rpm 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.
11. Das Pellet wurde in 5 ml 70 %igem Ethanol gewaschen, um die DNA zu fällen. Es wurde 5 Minuten bei 3500 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in ca. 800 µl TE Puffer aufgelöst. Die Proben wurden weiterverarbeitet oder bei – 20°C eingefroren.

Die Minipräparation erfolgte aus 0.5-1 ml Bakterienkulturen, die 4-16 h im Schüttelinkubator inkubiert wurden nach folgendem Protokoll:

1. Es wurden ca. 0.3-0.5 ml der Kulturen in 1.5 ml Eppendorf-Tubes 30 s bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl Puffer 1 resuspendiert.
2. Es wurden 100 µl Puffer 2 zur Proteindenaturierung hinzugegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.
3. Es wurden 100 µl Puffer 3 hinzugegeben und die Proben kurz geschüttelt .
4. Die Proben wurden 60 s bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde in ein anderes Eppendorf-Tube überführt und mit 600 µl Ethanol gemischt. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm. Danach wurde erneut mit 450 µl 70 %igem Ethanol gewaschen.
5. Die Proben wurden bei 13.000 rpm 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und die Plasmid-DNA wurde in 10 µl TE-Puffer aufgenommen und bei - 20 °C gelagert oder weiterverarbeitet.

Lösungen:

- | | |
|------------------------|---|
| 1. (Miniprep-)puffer 1 | 50 mM Tris, 10 mM EDTA, RNase 100 µg/ ml pH 8.0, Resuspensionspuffer (Aufbewahrung bei 4°C) |
| (Miniprep-)puffer 2 | 0.2 M NaOH, 20 % SDS (w/v), Lysepuffer |
| (Miniprep-)puffer 3 | 3 M KAC, pH 5.5 (mit Eisessig), Neutralessig |

2.6.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die quantitative Bestimmung der DNA erfolgte photometrisch (Sambrook et al.,1989): Dazu wurde die optische Dichte einer DNA-Lösung bei 260 nm gemessen. Um Proteinverunreinigungen zu kontrollieren, wurde die optische Dichte zusätzlich bei 280 nm bestimmt. Der Quotient aus OD₂₆₀ und OD₂₈₀ ergibt die Reinheit der DNA. Er sollte ein Verhältnis von 2:1 haben, um Proteinverunreinigungen auszuschließen. Dabei wurde davon ausgegangen, dass einer OD₂₆₀ von eins näherungsweise eine dsDNA von 50 µg/ml entspricht, bei ssDNA von 33µg/ml.

2.6.3 Restriktion von DNA

Zur Charakterisierung, Klonierung und Klonanalyse wurde die Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen verdaut. Dies sind Enzyme, die spezifische Sequenzen in doppelsträngiger DNA erkennen und spalten können. Der DNA wurde nach Angabe der Vertreiberfirmen der entsprechende 10-fach Restriktionspuffer zugegeben zusammen mit 1-10 U des Restriktionsenzym. Die Inkubationszeit betrug in der Regel, abhängig von der DNA-Menge, ca. 1 h. Die Inkubationstemperatur lag enzymabhängig (nach Angaben der Vertreiberfirma) meistens bei ca. 37 °C. Je nach weiterer Verwendung wurden die Ansätze entweder mit Probenpuffer versetzt und mittels Agarosegelelektrophorese analysiert, oder das Enzym wurde hitzeinaktiviert und die DNA ausgefällt.

2.6.4 Elution von DNA-Fragmenten

Für einige Experimente war es nötig, die in der Gelelektrophorese eingesetzte DNA wiederzugewinnen. Nachdem das Gel photographiert worden war, wurden die gewünschten Banden unter UV-Licht aus dem Gel herausgeschnitten. Die in dem Gel gebundene DNA wurde mit 600 µl TAE-Puffer in einen Dialysierschlauch gegeben. Diese wurden vorher durch dreimaliges Kochen in Wasser von ihrem starken Glyceringehalt befreit. Der Schlauch wurde in eine Gelkammer gelegt und mit Laufpuffer überschichtet. Nun folgte die Elektrophorese mit wechselnden Stromrichtungen und Zeitintervallen bei 80 mA (10 min in der üblichen Laufrichtung und dann wechselnd je 1 min, 30 s, 10 s, 5 s in jede Stromrichtung). Hierbei löste sich die DNA aus dem Gelblock und konnte mit dem TAE-Puffer aufgenommen werden. Im folgenden wurde die DNA mit Phenol und Chloroform gefällt, mit Ethanol präzipitiert und in H₂O aufgenommen oder weiterverarbeitet.

2.6.5 Amplifikation von DNA mittels PCR-Technik

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Technik, um gezielt beliebige DNA-Abschnitte zu amplifizieren, vorausgesetzt, die Sequenzen an den Enden des DNA-Bereichs sind bekannt. Das ist notwendig, weil zu Beginn zwei kurze Oligonukleotide als Primer für die DNA-Synthesereaktion mit dem DNA-Molekül hybridisieren müssen. Bei der PCR erhitzt man einen DNA-Doppelstrang, damit sich beide Stränge voneinander trennen. Die entstehenden Einzelstränge können dann mit Hilfe einer DNA-Polymerase verdoppelt werden. Hierzu benutzt man die hitzestabile *Taq*-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*) und die „vent-proof-reading“-Polymerase. Wiederholt man diesen Prozess mehrfach, steigt die Anzahl der Kopien der ursprünglichen Sequenz exponentiell an.

Die PCR wurde in einem PCR-Thermocycler (MWG-Biotech, Ebersberg) durchgeführt. Pro 50 µl Reaktionsansatz wurde etwa 1 µl (50-200 ng) template-DNA, 5 µl 10x PCR-Puffer, 10 µl (50 mmol) MgCl₂, je 2 µl (100 pmol/µl) Primer und je 1 µl (10 nmol/µl) dNTP eingesetzt. Die vier Basen Thymidin, Adenin, Cytosin und Guanin wurden in Form von Desoxyribonukleosid-Triphosphaten als Bausteine des neuen DNA-Strangs zugesetzt. MgCl₂ diente als aktivierende Substanz der *Taq*-Polymerase und „vent-proof-reading“ Polymerase. Um Verdampfung zu vermeiden, wurde der PCR-Ansatz mit 1-2 Tropfen Mineralöl überschichtet. Das gesuchte PCR-Produkt entstand bei folgenden 25 Zyklen: 30 s 95°C Denaturierung, bei der durch Lösen der Basenpaarungen die DNA-Einzelstränge entstehen, die dann in der nächsten Syntheserunde als Matrize dienen, 30 s Hybridisierung bei ca. 45-55°C (Temperatur nach den Angaben der Firma für das Reaktionsoptimum der Primer), bei der sich die Primer an die Matrize heften und 30 s Polymerisation bei 72°C, bei der die DNA-Synthese stattfindet. Der erste Denaturierungsschritt wurde über 3 min bei 95°C durchgeführt. Abschließend wurde die Polymerisation 5 min bei 72 °C komplettiert. In Tabelle 1 sind die verwendeten Primer mit ihrer Nukleotidsequenz angegeben.

Tabelle 1: für die PCR verwendete Primer (Tm: Melting Temperature, Reaktionsoptimum der angegebenen Primer)

pchr1	5`-CCC GGG CCA GTC GGG C- 3`	Tm: 64.6 °C
pchr2	5`-CCC GGG AAG GGC TGC A- 3`	Tm: 59.4 °C
pchr3	5`-CTG CAG CCC TTC CCG G- 3`	Tm: 59.4 °C
p1R	5`-CGG GAT CCG TCT TGT CTC CTT TTG- 3`	Tm: 64.4 °C
pAv	5`-TCCCTAGGGGAATTACAT- 3`	Tm: 57.6 °C
pCL	5`-GCG CTG AAG CAG CCA- 3`	Tm: 53.3 °C
pCR	5`-GTC GGC GAA CGC GTG- 3`	Tm: 56.0 °C
pNR1	5`-ACA TCG TCC GTT TGC AT- 3`	Tm: 50.4 °C
pNL1	5`-ACG ATG TAA TTC CCC- 3`	Tm: 45.1 °C
pNL2	5`-TGT GAG GAA ACC AGC CA- 3`	Tm: 52.8 °C
PR2	5`-CCG CAT CGC GTA TAT CGA TG- 3`	Tm: 62.0 °C

2.6.6 Dephosphorylierung von DNA

Die Behandlung von DNA-Molekülen mit alkalischer Phosphatase führt zur Abspaltung der terminalen 5`-Phosphatgruppen. Als Folge können durch Restriktionsspaltung erhaltene Plasmid-Fragmente nicht mehr mit sich selbst ligieren. Um ein DNA-Fragment (Insert) in einen passenden aufgeschnittenen Vektor zu ligieren, wurde dieser vorher mit SAP dephosphoryliert. Dazu wurden zum linearisierten Vektor 1 U SAP zugesetzt. Die Proben wurden 15 min bei 37 °C inkubiert, die Temperatur wurde für weitere 10 min auf 65 °C erhöht. Danach erfolgte die Extraktion der DNA mit Phenol-Chloroform, sowie das Ausfällen mit Ethanol.

2.6.7 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten mit homologen Restriktionsenden erfolgte mit T4-DNA-Ligase. Der entsprechende Vektor und die Insert-DNA wurden passend mit Restriktionsenzymen verdaut und nach Bedarf wurde die DNA dephosphoryliert. Es

erfolgte die Extraktion mit Phenol-Chloroform und die Fällung der DNA mittels Ethanol. Die Ligation erfolgte dann in entsprechendem Reaktionspuffer mit einem Vektor-DNA:Insert-DNA-Stoffmengenverhältnis zwischen 1:1 und 1:2. Dabei wurde ca. 0.1 µg Vektor-DNA verwendet. Es wurden folgende Ansätze für die Ligation in den Vektor pUC18 vorbereitet: 1µl Insert-DNA bzw. Vektor, 1µl 10x Ligations-Puffer und 1µl (1U) T4-Ligase in einem Endvolumen von 10 µl. Die DNA wurde 5 min auf 65 °C erhitzt und danach 3 min auf Eis abgekühlt. Danach wurden Puffer und Ligase zugegeben. Der Ligationsansatz wurde für mindestens 2 h bei Zimmertemperatur inkubiert. Die T4-Ligase wurde 10 min bei 65°C inaktiviert. Danach wurden die entstandenen Plasmide transformiert.

2.6.8 Herstellung von kompetenten Zellen und Hitzeschock-Methode, Transformation, Klonierung von Plasmidvektoren

Bei der Herstellung von kompetenten *E.coli*-Zellen wurden 1 ml *E.coli* HB 101 Bakterien in 50 ml SIN- Medium bis zu einer optischen Dichte bei 595 nm von 0.4-0.6 kultiviert. Die Kulturen wurden im Inkubator bei 180 rpm und 37°C ca. 2h geschüttelt. Nach dem Abzentrifugieren des Pellets (10 min bei 3500 rpm) wurden die Zellen in 15 ml 0.1 M autoklaviertem CaCl₂ aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min/ 3500 rpm) wurde das Pellet in 5 ml 0.1 M CaCl₂ resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert.

Für die nun folgende Hitzeschock-Methode wurden 100 µl der erhaltenen Suspension mit 1µl (100-400ng) des zu transformierenden Plasmids versetzt und nach kurzem Schütteln 30 min auf Eis inkubiert. Wenn es sich um frisch ligierte Plasmide handelte, wurden 10µl des Materials verwendet. Danach wurden die Zellen für exakt 90s bei 42°C im Wasserbad schockerhitzt um danach 5min auf Eis gekühlt zu werden. Die DNA lagert sich während der Kältebehandlung an die Zellmembran an und wird in der Wärme von den Zellen aufgenommen. Es folgte die Zugabe von 400µl SIN-Medium und eine Inkubation bei 110 rpm und 37°C für 1h. Daraufhin wurden die transformierten Zellen in 50ml mit Antibiotika versetztem SIN über Nacht bei 37°C bei

180 rpm im Schüttelinkubator inkubiert, um eine Plasmidisolierung folgen zu lassen, oder auf ein festes Medium gebracht.

Lösungen:

Calciumchlorid-Lösung: 0,1 M Calciumchloridlösung in Wasser

2.6.9 Isolierung von Proteinen

Mit verschiedenen Plasmiden transformierte *E.coli*-Bakterienkulturen wurden über Nacht mit SIN-Medium im Schüttelinkubator bei 180 rpm und 37°C inkubiert. Die Proben wurden 10 min bei 3.500 rpm abzentrifugiert. Die Pellets wurden in 3 ml PBS-Puffer unter Schütteln gelöst und je 5 min bei 3.500 rpm abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde dieser Vorgang noch zweimal wiederholt. Anschließend wurden die Pellets in 1ml PBS-Puffer resuspendiert und mindestens 30 min bei -80°C eingefroren. Nach der vorgeschriebenen Zeit wurden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut. Dieser Vorgang erfolgte mindestens dreimal. Die extremen Temperaturunterschiede lassen das Gesamtprotein der jeweiligen Zelle aus dieser heraustreten. Abschließend wurden die Proben 20 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich das gewonnene Protein befand, wurde in ein anderes Tube umpipettiert und weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert.

2.6.10 Proteinbestimmung

Der Proteinbestimmung nach Bradford (1976) liegt das Prinzip zugrunde, dass sich das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung aus Coomassie-Brillant-Blau G-250 von 465 nm zu 595 nm verschiebt, wenn Protein gebunden wird. Die Extinktionszunahme ist der Proteinkonzentration proportional und kann an einer mitgeführten Eichkurve abgelesen werden. Hierfür wurde mit BSA eine Eichkurve von 0µl, 5µl (62.5 µg/ml), 10µl (125 µg/ml), 15µl (187 µg/ml), 20µl (250 µg/ml) erstellt. Die Proben sowie die Eichkurvenansätze (beide jeweils 20µl) wurden mit 1 ml 1:5 verdünnter Roti-Quant-Lösung gemischt und die Extinktion nach 20 min bei 595 nm in einem Beckmann-DU-

62-Spectrophotometer gemessen. Anhand der Eichkurve konnte die Proteinkonzentration berechnet werden.

2.6.11 Agarosegelelektrophorese

Bei einem pH von 7.5 sind DNA-Moleküle insgesamt negativ geladen und bewegen sich bei einer angelegten elektrischen Spannung zur Anode. Die Agarosegelelektrophorese gilt als Standardmethode zur Trennung, Identifizierung und Reinigung von DNA-Molekülen. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA im Agarosegel ist abhängig von dem Molekulargewicht und der Konformation der DNA, von der Agarosekonzentration, d.h. der Porengröße des Gels, und von der elektrischen Feldstärke im Gel. Innerhalb eines gewissen Bereichs ist die Wanderungsgeschwindigkeit linearer doppelsträngiger DNA umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts. Das Molekulargewicht eines DNA-Fragments unbekannter Größe kann daher aus seiner Wanderungsstrecke bestimmt werden, indem neben der unbekannten DNA-Probe ein Längenstandard elektrophoretisch aufgetragen wird. Als Längenstandard diente zumeist ein 1 kb-Marker. Der 1 kb-Marker lässt eine Aufteilung in 14 Fragmente erkennen von 10 kb, 8 kb, 6 kb, 5 kb, 4 kb, 3.5 kb, 3 kb, 2.5 kb, 2 kb, 1.5 kb, 0.75 kb, 0.5 kb und 0.25 kb Länge. Teilweise wurden eigene Längenstandards, ausgehend von pUC18, verwendet. Der Vektor wurde jeweils mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut, um definierte DNA-Fragmente als Längenvergleich zu erhalten. Bei dem Verdau von pUC18 mit *HinfI* ergaben sich 6 Fragmente (1419 bp, 517 bp, 396 bp, 214 bp, 75 bp, 65 bp). Für die Gelelektrophorese wurden horizontale Gele mit Agarosekonzentrationen von 0.7 bis 1.5 % (w/v), für DNA-Fragmente unter einer zu erwartenden Länge von 200 bp wurde eine 4 % Agarose verwendet. Bei der Präparation der DNA für eine nachfolgende Ligation wurde „low-melting“-Agarose verwendet, da die „low melting“-Agarose die Aktivität der T4-Ligase nicht beeinträchtigt. Zur Herstellung des Gels wurde die Agarose durch Aufkochen in 1x TAE gelöst und nach dem Abkühlen auf ca. 60°C in das Gelbett gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde es in der Gelkammer in 1x TAE Laufpuffer überschichtet. Die Proben wurden mit Probenpuffer vermischt und zusammen mit dem Längenstandard aufgetragen. Da Ethidiumbromid doppelsträngige

DNA interkaliert, werden im Gel aufgetrennte DNA-Banden im UV-Licht sichtbar. Nachdem die Gele bei Raumtemperatur und 70-150 mA gefahren worden waren, wurden die Proben im 0.03 %igem Ethidiumbromidbad gefärbt. Dazu wurde das Gel 5 min langsam in der Ethidiumbromidlösung geschwenkt, danach 5 min in H₂O. Das Gel wurde unter UV-Belichtung bei 254 nm durch einen vorgesetzten Rotlichtfilter fotografiert. Wenn nach der Agarosegelelektrophorese die Präparation der DNA erfolgte, wurde unter einer UV-Belichtung von 366 nm photographiert, um die DNA nicht zu schädigen. Zum Teil wurden die erhaltenen Banden ausgeschnitten zur weiteren Elution (s. 2.6.4). Teilweise wurden auch Polyacrylamidgele gefahren. Mit der Auftrennung in einer hochauflösenden Acryl-Matrix ist eine genaue Auswertung möglich. 1,333 ml 30 %iges Acrylamidlösung und 0,284 ml 87 %iges Glycerin wurden mit 1x TBE Puffer in 10 ml Volumen gelöst. Die Gellösung polymerisierte unter Zugabe von 75 µl APS/AMS und 7,5 µl TEMED. Die Gele liefen über Nacht mit 1x TBE-Puffer als Laufpuffer bei 4 °C.

Lösungen:

TAE-Puffer	40 mM Tris/ Acetat, pH 8,0, 1mM EDTA
Probenpuffer	0,25% (w/v) Bromphenol-Blau, 30 % Glycerol
TBE-Puffer	(10x) 54 g TRIS, 27.5 g Borsäure, 20 ml 0.5 M EDTA

2.6.12 Electrophoretic Mobility Shift Assay

Der Electrophoretic Mobility Shift Assay (Bandshift Assay) ist für quantitative Analysen von Protein-DNA-Wechselwirkungen gut geeignet. Beim Mobilitätstest bestimmt man die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit eines nicht-radioaktiv oder radioaktiv markierten DNA-Fragments in Gegenwart oder Abwesenheit eines spezifisch an die DNA bindenden Proteins. Die Proteinbindung verringert die Beweglichkeit des DNA-Fragments. Dies führt zur Verschiebung des Fragments an eine andere Stelle der Autoradiographie.

2.6.12.1 Labeling von DNA

Es wurden zwei verschiedene Methoden verwendet, um die DNA für die Bandshift Assays zu markieren. Es wurde sowohl nicht-radioaktiv mit Digoxigenin, als auch radioaktiv mit 32 Phosphat nach folgendem Protokoll markiert:

1. Die DNA wurde nicht-radioaktiv mit dem Steroid-Hapten Digoxigenin nach dem Protokoll der Firma Boehringer-Mannheim gelabelt. Es wurde der DIG DNA Labeling and Detection Kit verwendet. Zuerst wurde das benötigte DNA-Fragment isoliert. Dann wurden 15µl der isolierten DNA 10 min bei 100°C inkubiert, danach wurden die Proben 5 min auf Eis gekühlt. Es wurden 2µl Hexanucleotid Mix, 2µl dNTP Mix und 1µl Klenow-Enzym zugegeben. Die Lösung wurde vorsichtig geschüttelt und entweder für mindestens 1 h, meist jedoch über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurden 2µl 0,2 M EDTA, 2,5µl 4 M Lithiumchlorid und 75µl gekühltes Ethanol hinzugefügt. Die Probe wurde für 30 min bei -80 °C eingefroren, danach 10 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert und mit 70 % igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in 50µl TE-Puffer aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2. Die DNA wurde auch radioaktiv mit $[\gamma^{32}\text{p}]\text{ATP}$ unter Verwendung des DNA 5' Endlabeling Kit markiert. Dazu wurden 5µl DNA, 2µl Puffer und 20pmol $[\gamma^{32}\text{p}]\text{ATP}$ in ein Gesamtvolumen von 20µl H₂O gebracht. Es wurde 1µl (1U) T4-Polynuclease-Kinase hinzugefügt und die Lösung zwischen 30 min und 1 h bei 37°C inkubiert. Die T4-Polynuclease-Kinase wurde bei 70°C 10 min inaktiviert. Im folgenden wurden die Proben mit je 100 % und 70 % igem Ethanol gewaschen, um die DNA zu fällen. Die gelabelte DNA wurde in TE-Puffer aufgenommen.

2.6.12.2 Southern Blot

Da man mit der Sequenzierung eines ganzen Genoms viel Mühe und Zeit verwenden müsste, wurde versucht, mit einer von Southern (1975) entwickelten Methode auszuloten, auf welchem Teil des Genoms das gesuchte Gen enthalten ist. Diese Methode beruht auf Kapillarkräften, die durch einen Flüssigkeitsstrom aus einem Pufferreservoir den Transfer der Nukleinsäuren auf die Membran durch das Gel bewirken. Dort werden sie durch die positive Ladung der Membran gebunden. Nach Verdau der DNA mit jeweils diversen Restriktionsenzymen, Trennung der DNA-Fragmente in 1 %igen Agarosegelen bei 150-200mA und Anfertigen eines Kontrollphotos wurde das Gel 30 min in 200 ml Denaturierungslösung geschwenkt und dann für 30 min in 200 ml Neutralisierungslösung neutralisiert. Der pH des Gels sollte 7-8 betragen und wurde vor Weiterführung des Versuchs mit pH-Meßstreifen nachgeprüft. Das Gel wurde wie folgt in den Blotaufbau integriert: Der Blotaufbau bestand aus einem mit 200 ml 20x SSC gefülltem Pufferreservoir, auf dessen Rändern eine Glasplatte lag. Zwei Lagen Whatman 3MM Papier wurden in 20x SSC getränkt und so auf die Glasplatte gelegt, dass beide Enden in den Transferpuffer tauchten. Auf das Whatman Papier wurde das Gel und darauf die mit Aqua Bidest benetzte Nylonmembran gelegt. Darauf folgten einige Lagen Filterpapier, sowie ein Stapel Zellstoff, der mit ca. 1 kg beschwert wurde. Der Transfer wurde über Nacht durchgeführt. Danach wurde die Nylonmembran vorsichtig in 2x SSC gewaschen und die DNA durch zweistündiges „Backen“ bei 80 °C irreversibel auf der Membran fixiert.

Lösungen:

Denaturierungslösung	1.5 M NaCl, 0.5 N NaOH
Neutralisierungslösung	0.5 M Tris/ CL, 1.5 M NaCl, 0.5 N HCL

2.6.12.3 DNA-DNA-Hybridisierung

Im weiteren erfolgte die Hybridisierung. Dazu wurde die Membran mit 10 ml Prähybridisierungslösung eng in eine Plastikfolie eingeschweißt und danach 1 h bei

68°C inkubiert. Es wurden 12.5µl mit Digoxigenin gelabelte DNA in 5 ml Prähybridisierungslösung gelöst, 5 min über dem Bunsenbrenner gekocht und dann auf Eis gestellt. Diese Hybridisierungslösung wurde, nachdem die Prähybridisierungslösung aus der Plastikfolie entfernt worden war, hinzugegeben und über Nacht bei 68°C inkubiert. Um die unspezifisch gebundene DNA abzuwaschen, wurde die Membran je 2x 5 min in 2x SSC, 0.1 % SDS gewaschen. Es folgten zwei weitere Waschgänge von je 15 min bei 68 °C mit 0.1 M SSC, 0.1% SDS.

2.6.12.4 Detektion

Die Ergebnisse der Hybridisierung konnten nach folgenden Protokollen auf verschiedene Weisen sichtbar gemacht werden.

1. Die Detektion erfolgte bei dem nicht-radioaktiven Verfahren mit alkalischer Phosphatase markierten Anti-Digoxigenin-Antikörpern, wobei die Visualisierung über eine Farbreaktion oder eine Chemolumineszenz-Reaktion durchgeführt wurde. Für die Detektion der hybridisierten Sonden wurde die Membran für 30 min bei Raumtemperatur in 50 ml Blocking-Puffer unter vorsichtigem Schütteln inkubiert. Dann wurden 2.5 µl (1:20.000) alkalische Phosphatase markierte Anti-Digoxigenin Antikörper (Fab-Fragmente) hinzugefügt und für weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden im Anschluss durch 2x 15 min in Wasch-Puffer entfernt.

Lösungen:

Blocking-Puffer	1% Blocking Reagenz in Maleinsäurepuffer (w/v)
Waschpuffer	0.1 M Maleinsäurepuffer, 3% (v/v) Tween 20
Detektionslösung	0.1 M Tris/ HCl, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl ₂ , pH 9.5

a) Visualisierung mittels alkalischer Phosphatase/Farbreaktion

X-Phosphat dient als Substrat der alkalischen Phosphatase. In Kombination mit NBT als Elektronenrezeptor ist das Produkt ein unlöslicher, violetter Indigofarbstoff. Hierzu wurde die Membran in 10 ml Detektionslösung 3 min inkubiert. Im weiteren wurden 200 µl NBT/ BCIP in 10 ml Detektionslösung gelöst und zusammen mit der Membran unter Lichtausschluss in Plastikfolie eingeschweißt und solange inkubiert, bis die gewünschte Farbintensität erreicht war. Die Farbreaktion konnte durch Zugabe von ca. 5 ml TE-Puffer gestoppt werden

b) Visualisierung mittels alkalischer Phosphatase/ Chemolumineszenz

Nachdem auch hier die oben beschriebene Reaktion, bei der die Hybridisierungssonde mit den Anti-Digoxigenin-Antikörpern reagiert, abgelaufen war, wurde eine weitere Visualisierungsmethode verwendet. Sie wurde mittels Chemolumineszenz durchgeführt. CSPD[®] ist ein Chemolumineszenz-Substrat für die alkalische Phosphatase. Die enzymatische Dephosphorylierung von CSPD bewirkt eine Lumineszenz im Bereich von 477 nm, die auf einem Röntgenfilm detektiert werden kann. Diese Methode wurde zur Detektion der Southern-Hybridisierungen verwendet. Die Membran wurde in 10 ml Detektionslösung 10 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Membran 5-15 min in 10 ml Detektionslösung/ 100 µl CSPD (1:100) geschwenkt, in durchsichtige Folie gewickelt und je nach gewünschter Intensität des Signals ein Film (X-OMAT AE, Kodak) für 1-2 h exponiert. Für die Entwicklung der Autoradiographien wurde der Film für 10 min in Entwickler und danach für 10 min in Fixierer geschwenkt. Nach intensivem Wässern wurde der Film getrocknet und ausgewertet.

Lösungen:

Entwickler	Tetenal (Dokumol 1:20 verdünnt in H ₂ O)
Fixierer	1.26 M Natriumthiosulfat, 0.11 M Natriumdithionit

2.6.12.5 Gel-Shift-Elektrophorese

Die Gel-Shift-Elektrophorese wurde, wie einleitend schon beschrieben, hier verwendet, um DNA-Protein-Wechselwirkungen deutlich zu machen. Dazu wurde im Prinzip die oben beschriebene Methode des Southern Blots verwendet, jedoch wurde vor Beladung des Gels die mit Restriktionsenzymen geschnittene DNA mit extrahiertem Gesamtprotein inkubiert und zusammen auf das Gel aufgetragen. Diese Methode macht die Wechselwirkung zwischen DNA und Protein insofern sichtbar, als die DNA-Banden, an die Protein gebunden ist, im Gel aufgrund ihrer erhöhten Masse und Größe durch eine verlangsamte Laufgeschwindigkeit auffallen. Die betroffenen DNA-Banden sind also auf den Photos oder der Nylon-Transfer-Membran nicht so weit gelaufen, wie es ihre Größe normalerweise vermuten ließe. Die Proteinmenge und DNA-Menge wurden anfangs titriert. Bei der Inkubation der DNA mit dem Protein wurden verschiedene Zeiträume gewählt, die Temperatur betrug 37°C. Die weiteren Schritte erfolgten wie oben beschrieben. Es wurde TAE-Puffer (TAE-Puffer: 40 mM Tris/Acetat, pH 8,0, 1mM EDTA) als Laufpuffer verwendet. Die Konzentration des Puffers kann maßgeblich auf die DNA-Proteinbindung einwirken.

2.7 Biochemische Methoden

2.7.1 Bestimmung der Enzymaktivitäten der 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Für einige Substrate der 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase konnte die Bestimmung der kinetischen Parameter durch direkte Messung der entstandenen Produkte über die „High Pressure (Performance) Liquid Chromatography“ (HPLC) erfolgen. Eine Quantifizierung erfolgte durch Eichkurven der gebildeten Produkte. Der Umsatz von Metyrapon wurde nach dem Prinzip der „reversed phase“ bestimmt. Hierbei werden hydrophobe Substanzen besser auf dem Säulenmaterial gebunden als hydrophile und eluieren dementsprechend später beim Gebrauch eines polaren Eluenten (Laufmittel). Als mobile Phase wurde ein Eluent aus 30 % Acetonitril (v/v) und 0.1% Ammoniumacetat, pH 7.2 verwendet. Die stationäre Phase bestand aus einer C18-Säule (LiChrospher 100 RP-18; Porengröße: 5 μ m, Säulenmaße: 250 x 4 mm der Firma Merck). Die Detektion erfolgte bei 254 nm und die Integration und Berechnung der Peakflächen wurde durch einen SHIMADZU-Integrator (C-R6A Chromatopac) erhalten.

3 ERGEBNISSE

3.1 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Die 3α -HSD/ CR ist maßgeblich beim Steroidabbau in *C. testosteroni* beteiligt. Bei ihr handelt es sich, wie schon beschrieben, um ein Enzym, dass unter der Kontrolle des jeweiligen Substrates steht.

Hier folgen nun die Ergebnisse, die mittels des Electrophoretic mobility shift assay bezüglich der Suche nach für Repressoren und Operatoren codierende Gensequenzen erhalten wurden. Als Ausgangssequenz wurde ein in pUC18 kloniertes DNA-Fragment verwendet, das Plasmid p6 mit einer Länge von 5257 bp (Abb.8), (Xiong et Maser, 2001).

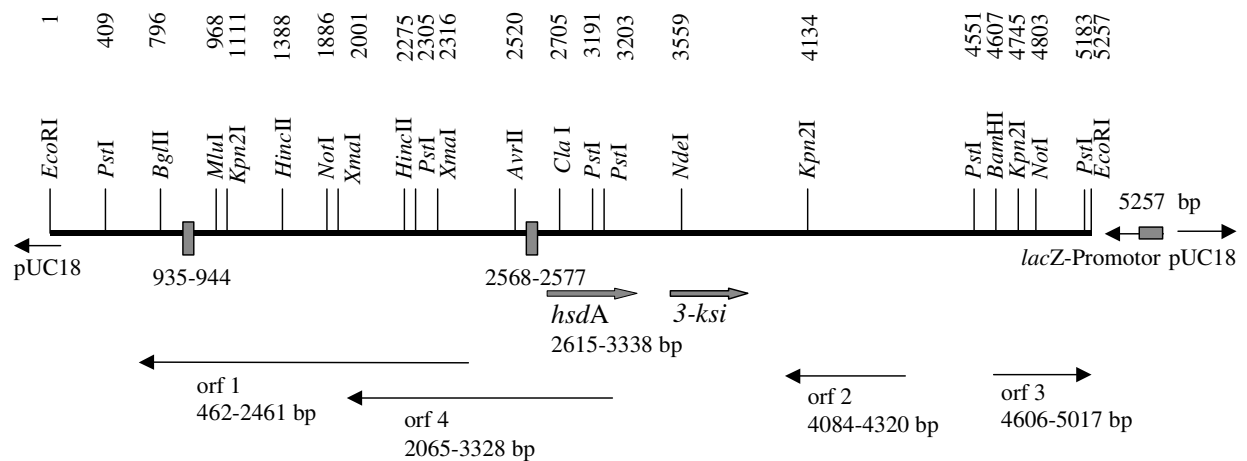


Abb.8: p6 (5.257 kb), Erklärung siehe Text

Das Insert von p6, das in dieser Arbeitsgruppe beim Screenen einer *C. testosteroni*-Gen-Bank mit einer homologen Oligonukleotid-Sonde für das 3α -HSD-Gen (*hsdA*) im Southern-Blot erkannt, kloniert und sequenziert wurde (Möbus et Maser, 1998), enthält die Gensequenz für die 3α -HSD (*hsdA*), die Gensequenz (*3-ksi*) für ein weiteres am Steroidstoffwechsel beteiligtes Enzym, der 3-Ketosteroid-Isomerase und verschiedene offene Leserahmen (orf). Der orf 1 erstreckt sich von 462 – 2461 bp, der orf 2 von 4084 – 4320 bp, der orf 3 von 4606–5017 bp und der orf 4 von 2065–3328 bp. orf1, orf 2 und orf 4 liegen entgegen der Richtung von *hsdA*, orf 3 in Richtung von *hsdA*. p6 wurde als

Ausgangsplasmid für die Suche nach Operator- und Repressorsequenzen verwendet, da es aufgrund seines Umfangs wahrscheinlich diese Sequenzen enthält. Ein erstes orientierendes Experiment zur groben Eingrenzung der interessanten Regionen folgte.

3.2 Orientierender EMSA mit aus dem Verdau von p6 entstandenen DNA-Fragmenten und Gesamtprotein aus p6 (EMSA I)

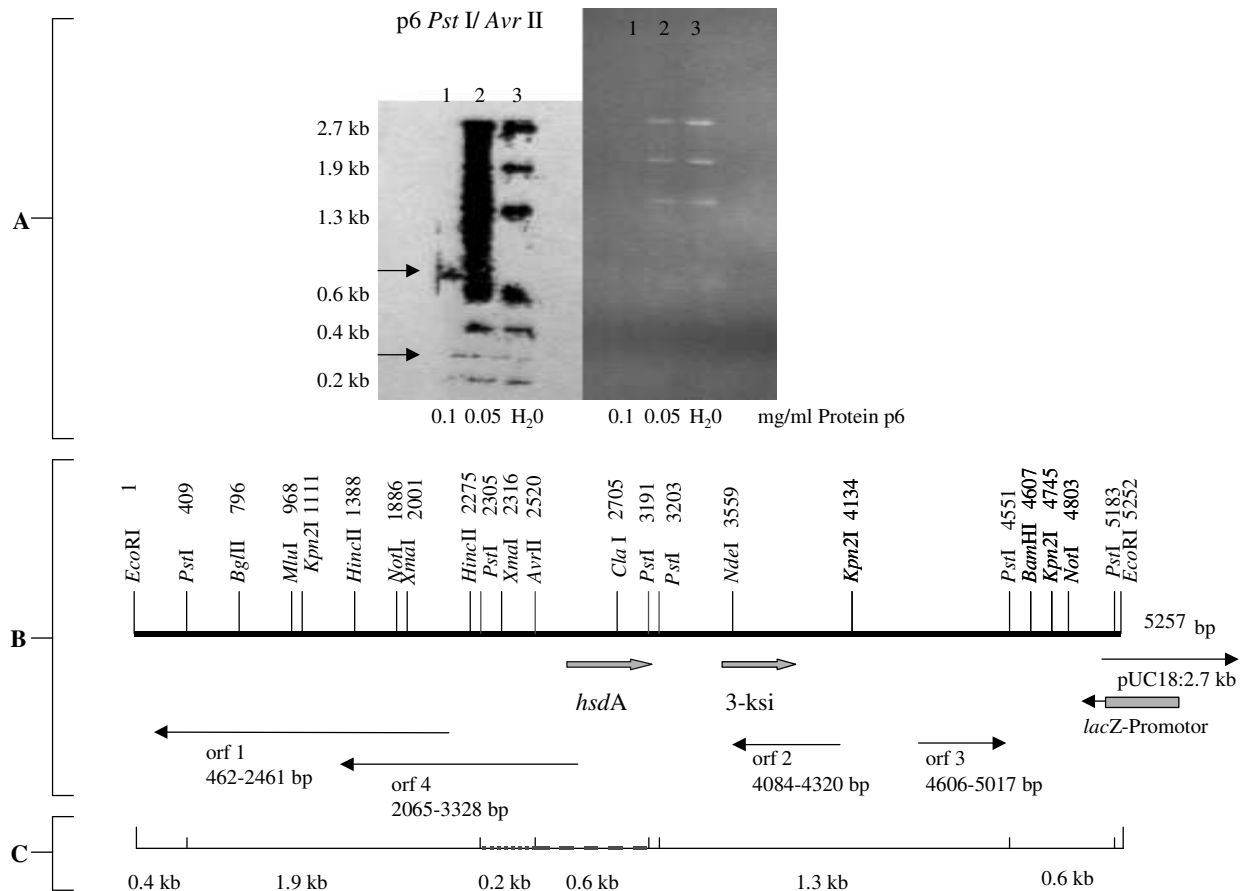


Abb. 9: Erster orientierender EMSA mit DNA-Fragmenten, die aus dem Verdau von p6 mit *Pst* I und *Avr* II entstanden sind und Gesamtprotein aus p6

- A) Rechtes Bild: Agarosegelelektrophorese mit DNA-Fragmenten vom Plasmid p6 + Restriktionsenzyme *Pst* I/ *Avr* II + Gesamtprotein von Plasmid p6, Spur 1: 0.1 mg/ml Protein, Spur 2: 0.05 mg/ml Protein, Spur 3: H₂O
 Linkes Bild: Southern Blot mit DNA-Fragmenten vom Plasmid p6 + Restriktionsenzyme *Pst* I/ *Avr* II + Gesamtprotein p6 (links), Spur 1: 0.1 mg/ml Protein, Spur 2: 0.05 mg/ml Protein, Spur 3: H₂O. Die Pfeile geben die durch Bandshift retardierten DNA-Banden von ca. 0.3 kb und 0.7 kb Größe an.
- B) p6 mit verschiedenen Schnittstellen von Restriktionsenzymen, orf 1-4, *hsdA* (blau), *lacZ*-Promotor, relevante *Pst* I/ *Avr* II-Schnittstellen bunt markiert
- C) schematisch: DNA-Fragmente nach Restriktionsverdau von Plasmid p6 + *Pst* I/ *Avr* II, relevante 0.2 kb-Fragment und 0.6 kb-Fragment grün gestrichelt markiert

Das erste orientierende Bandshift-Experiment, im folgenden EMSA I benannt, erfolgte mit DNA-Fragmenten, die durch den Verdau von p6 mit *Pst*II/ *Avr*II erhalten wurden (Abbildung 9/A). Als DNA-Sonde zur DNA-DNA-Hybridisierung (Kap. 2.6.12.3)

wurde das 5257 bp *Eco*RI-Fragment (Abbildung 9/B) verwendet, das nicht radioaktiv mit Digoxigenin (Kap. 2.6.12.1) markiert wurde. In Abbildung 9/B ist das 5257 bp *Eco*RI-Fragment (p6) zu sehen, kloniert in pUC18 (Xiong et Maser, 2001). In Abbildung 9/C ist der Verdau von p6 mit *Pst*I und *Avr*II dargestellt. Es entstehen durch diese Schnittstellen sieben DNA-Fragmente von ca. 0.4 kb, 1.9 kb, 0.2 kb, 0.6 kb, 1.3 kb und 0.6 kb Länge, sowie ein großes 2.7 kb Fragment, das unter anderem den Vektor pUC18 enthält. Die Abbildung 9/A zeigt rechts das Ergebnis der Agarosegelelektrophorese. Das mit der DNA inkubierte Gesamtprotein stammt von p6 und hatte eine Größe von ca. 30 kDa.. Protein und DNA wurden anfangs 20 min bei 37°C inkubiert. Es wurden verschiedene Proteinkonzentrationen verwendet: 2.0 mg/ml, 1.0 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.05 mg/ml und H₂O. Auf dem Photo werden nicht alle erwarteten Banden gezeigt, besonders in den Ansätzen mit hoher Proteinkonzentration waren keine Banden mehr zu erkennen. Es kann vermutet werden, dass es, da Gesamtprotein von p6 generiert in *E.coli* (Kap. 2.6.9) verwendet wurde, zu höheren Konzentrationen von DNase gekommen ist und eventuell Teile der DNA unspezifisch verdaut wurden (Sambrook et al., 1989). Die Ergebnisse des Southern-Blots befinden sich links im Bild. In Spur 3 des Southern Blots (Abb. 9/A/links) erkennt man die genannten Fragmente inkubiert mit H₂O, in Spur 1 und 2 inkubiert mit 0.1 µg/ml und 0.05 µg/ml Gesamtprotein, gewonnen von p6. Die mit höheren Proteinkonzentrationen inkubierten DNA-Fragmente erscheinen, wie auch auf dem Photo (Abb. 9/A/rechts), nicht. In der Spur 1, in der die sechs erwarteten DNA-Fragmente nicht zu sehen sind, erscheint eine DNA-Bande, die vermutlich durch einen Bandshift entstanden ist, von ca. 0.7 kb Größe (Abb. 9/A, oberer Pfeil). Auch auf der Höhe von etwa 0.3 kb lassen sich schwache DNA-Banden erkennen, die nicht durch den Verdau von p6 zu erklären sind (Abb. 9/A, unterer Pfeil). Hier könnte es sich ebenfalls um einen Bandshift handeln. Die DNA-Fragmente, die durch eine Proteinbindung durch einen Repressor geshiftet sind, sind im ersten Fall das 0.6 kb DNA-Fragment (Abbildung 9/C), welches sich im Bereich von 2520-3191 bp ausdehnt und im zweiten Fall das 0.2 kb DNA-Fragment, welches im Bereich von 2305- 2520 bp liegt (Abbildung 9/C). Der Nachweis im Southern-Blot erfolgt mittels Farbreaktion.

3.3 Suche nach den Operatoren der 3 α -Hydroxysteroid-dehydrogenase

Im experimentellen Teil dieser Arbeit hatten die Ergebnisse oft eine mehrfache Bedeutung, d.h. ein EMSA gab oft Hinweise auf eine möglich Operatorsequenz wie auch auf eine möglich Repressorsequenz. Um die Übersichtlichkeit zu verbessern, wird hier mit der Darstellung der Ergebnisse begonnen, die sich mit der Eingrenzung möglicher Operatorsequenzen befassen.

3.3.1 Darstellung möglicher Operatorsequenzen

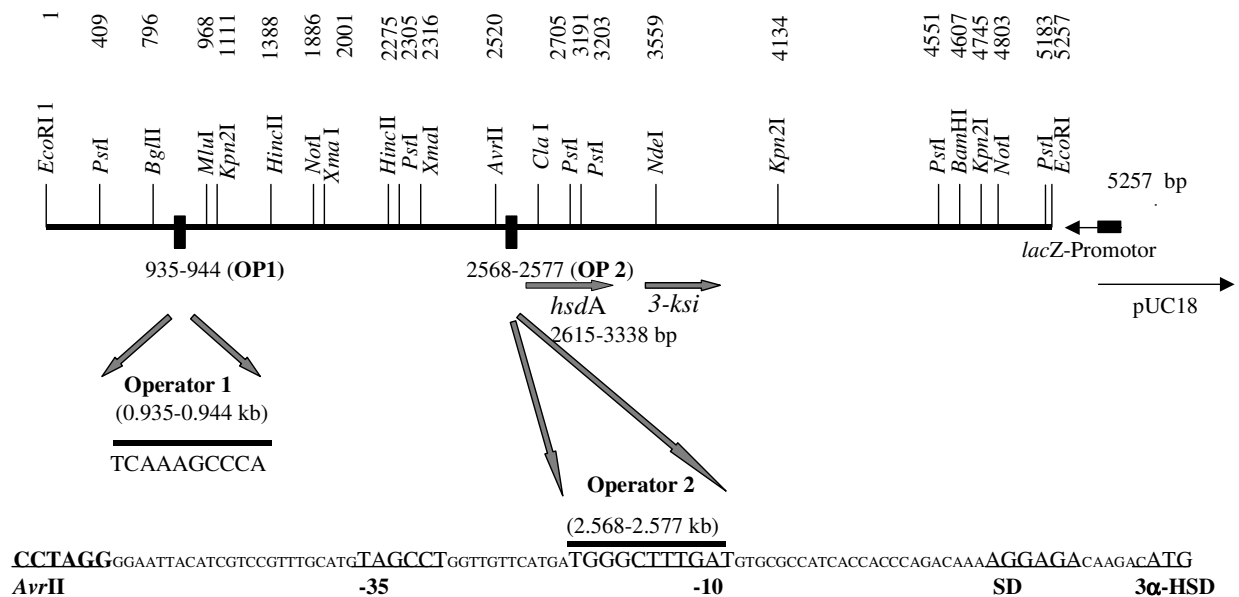


Abb. 10: Plasmid p6 mit einigen wichtigen Strukturen wie *hsdA*, *3-ksi* und mögliche palindromische Operatorsequenzen OP1 und OP2.

Mittels Computeranalysen konnten auf der Sequenz des Plasmids p6 (Abb. 10) mögliche Bindungsstellen für Repressorproteine gefunden werden. Es wurden zwei zueinander pallindromische Sequenzen mit einer Länge von 10 Nukleotiden gefunden. Sie liegen im Abstand von 1633 bp zueinander. Im folgenden Teil dieser Arbeit werden die Bezeichnungen OP1 für die weiter stromaufwärts gelegene pallindromische Sequenz (0.935 – 0.944 kb) und OP2 für die in der Nähe von *hsdA* gelegene pallindromische Sequenz (2.568 – 2.577 kb) gewählt. Es wurden gemäß des ersten Experiments (EMSA

I, Abb. 9), bei dem eine Proteinbindung im und um den Bereich von OP2 gesehen wurde (0.6 kb Fragment und 0.2 kb Fragment, Abb. 9/C), sowie gemäss der entsprechenden Computeranalysen, die Regionen OP1 und OP2 auf ihre Bindungsfähigkeit und ihr Verhalten im Sinne eines Operators weiter untersucht. Der Bereich des OP1 erschien im EMSA nicht als geshiftete Bande und war in einer längeren DNA-Sequenz von 1.9 kb enthalten (Abb. 9). Mögliche Ursache hierfür könnte ein Verdau des Fragments durch proteineigene DNase sein.

3.3.2 Vergleich der Sequenzen OP1 und OP2 mit den im EMSA I retardierten DNA-Fragmenten

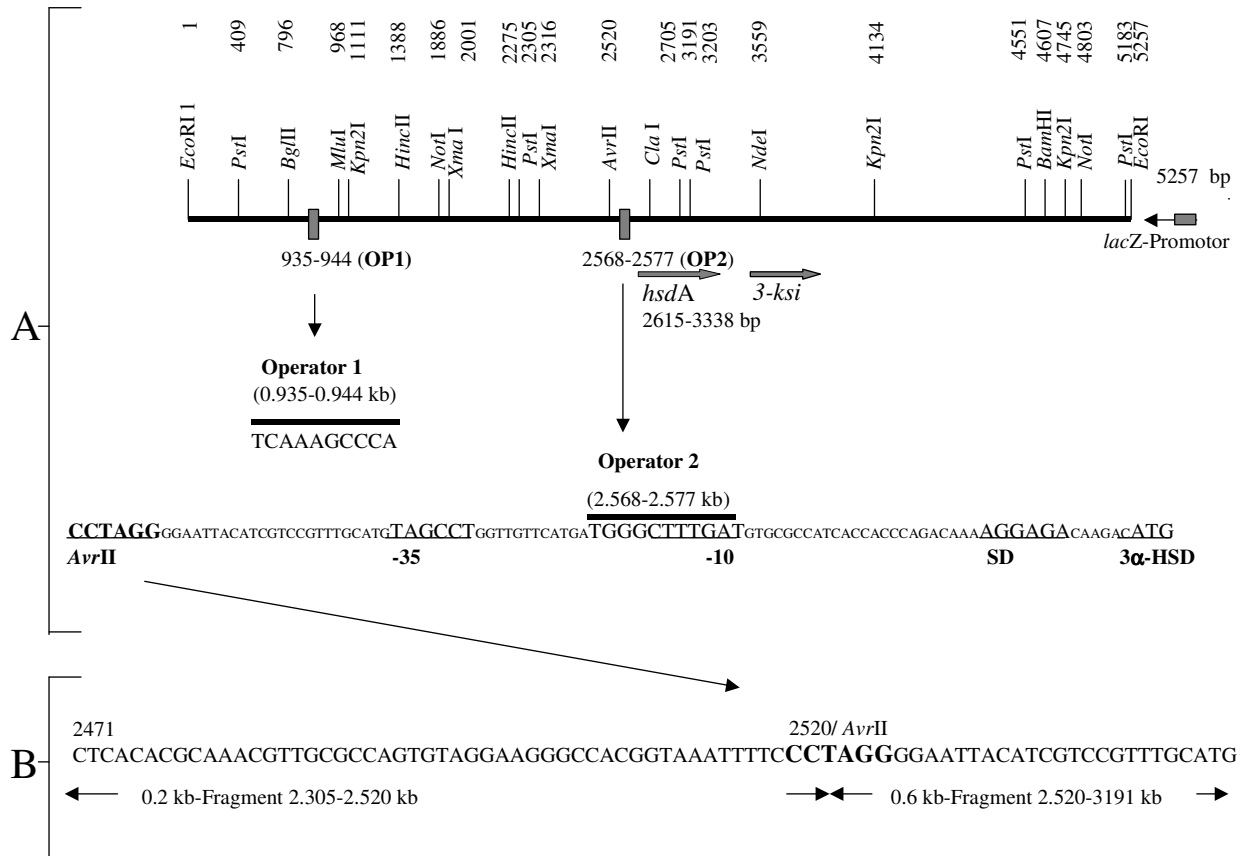


Abb. 11:

- A) p6 mit einigen wichtigen Strukturen wie *hsdA*, *3-ksi* und mögliche palindromische Operatorsequenzen OP1 und OP2
- B) Ausschnitte der Gensequenz rechts und links der *AvrII*-Schnittstelle, entsprechend den im EMSA unter Abb. 9 retardierten DNA-Banden (0.2 kb-Fragment links von *AvrII*, 0.6 kb-Fragment rechts von *AvrII*)

In Abbildung 11/A erkennt man die Sequenz von p6 mit den Schnittstellen der verschiedenen Restriktionsenzyme. Außerdem sind hier, wie schon oben beschrieben, die Gensequenzen des Abschnitts von der *AvrII*-Schnittstelle bis zum Start von *hsdA* und die Sequenzen von OP1 und OP2 dargestellt. In Abbildung 11/B kann man die Sequenz um die *AvrII*-Schnittstelle sehen, dem wichtigen Bereich für das erste Bandshift-Experiment (Abb.9). Die zwei retardierten DNA-Fragmente erstrecken sich jeweils rechts und links von der *AvrII*-Schnittstelle (0.6 kb-DNA-Fragment: 2520–3991 bp, Abb. 11 und Abb. 9/C; 0.2 kb-DNA-Fragment: 2305 – 2520 bp, Abb. 11 und Abb.

9/C). Es ist zu erkennen, dass das 0.6 kb-Fragment den Bereich des OP2 enthält, das 0.2 kb-Fragment nur an ihn heranreicht. Diese Bereiche wurden im folgenden weiter untersucht, wie auch der Bereich um OP1. Es stellten sich aber auch Fragen nach der Qualität und Größe des Repressorproteins bzw. der Repressorproteine. Vielleicht handelt es sich, wie in Mikroorganismen häufig, um Dimere oder Tetramere (Müller-Hill, 1998), die durch ihre Größe an einen längeren Abschnitt auf der DNA binden, als nur an die zwei Regionen OP1 und OP2, die lediglich 10 Nukleotide umfassen.

3.3.3 DNA-Fragmente für folgende EMSA

Für die nun folgenden EMSA wurden verschiedene DNA-Fragmente benötigt (Abb. 12). Es wurden verschiedene Fragmente hergestellt, die zum Teil mit dem Gen der 3 α - HSD überlappen oder vor dem Beginn ihres Gens liegen, weil hier, wie beschrieben, ein Operatormotiv (OP2, Abb.10/11) vermutet wurde.

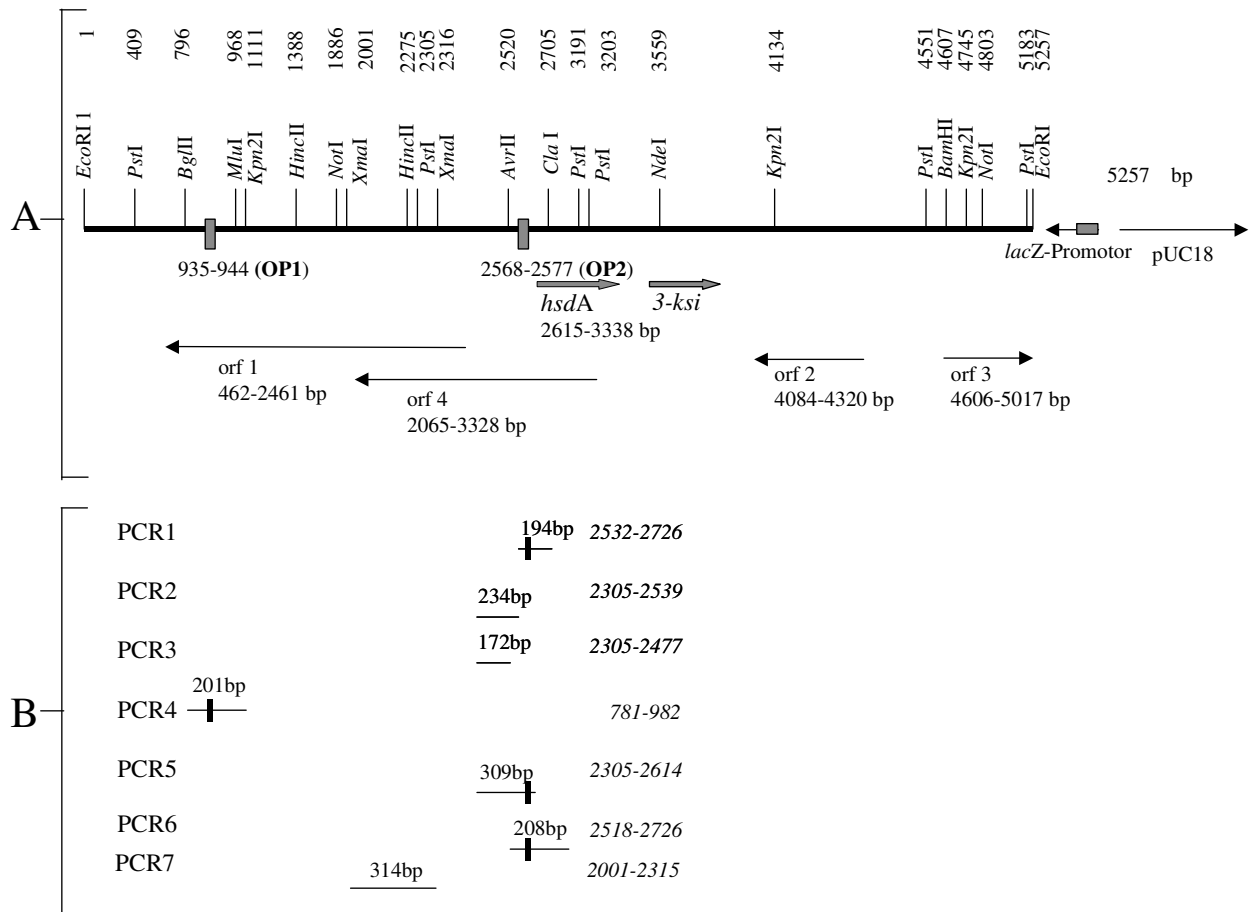


Abb. 12: PCR-Produkte, die für die folgenden EMSA verwendet wurden:

- A) p6 mit verschiedenen Restriktionsenzymschnittstellen
- B) PCR 1 – PCR 7 mit der jeweiligen Längenangabe und Lage auf p6, bei einigen PCR-Fragmenten ist ein schwarzer Balken markiert. Dieser zeigt, ob das jeweilige Fragment eine der beiden bereits erklärten palindromischen Sequenzen OP1 oder OP2 enthält. Nebenstehend Primer der jeweiligen PCR-Fragmente.

Diese Annahme wurde durch den ersten EMSA gestützt, bei dem das gesamte 5257 bp lange Plasmid p6 mit *Pst I* / *Avr II* verdaut und anschließend mit dem Gesamtprotein, das aus p6 gewonnen worden war, inkubiert wurde. Damit konnten bestimmte Bereiche,

die um die *AvrII* Schnittstelle (2520 bp) lagen, näher als potentielle Bindungsstellen eingegrenzt werden (Abb. 9).

Ebenso wurde der durch Computeranalysen erhaltene Hinweis auf die zwei beschriebenen palindromische Sequenzen (OP1 und OP2) verfolgt und entsprechende DNA-Fragmente mittels PCR generiert. Im folgenden wird auf die einzelnen DNA-Fragmente näher eingegangen (Abb. 12).

PCR1 zeigt ein 194 bp (2532-2726 bp) großes DNA-Fragment, welches die eine der beiden 10nt langen palindromischen Sequenzen (2568-2577 bp, OP2) enthält, die auf eine mögliche Operatoraktivität untersucht werden sollen. PCR 2 liegt ca. 30 bp weiter vor *hsdA* und ist 234 bp lang (2305-2539 bp). Es umfasst das retardierte 0.2 kb-Fragment aus EMSA I (Abb. 9), das so weiter untersucht werden sollte. PCR 3 beginnt an derselben Stelle wie PCR 2, ist aber weniger lang (2305-2477 bp). Sowohl PCR 2 als auch PCR 3 schließen die palindromische 10nt-Sequenz (OP2) nicht mit ein. PCR 4 wurde aus dem Bereich gewählt, der die andere palindromische 10nt-Sequenz (935-944 bp, OP1) enthält. PCR 5 und PCR 6 sind etwas länger als PCR 1 (PCR 5: 2305-2614 bp, PCR 6: 2518-2726 bp) und umfassen OP2. PCR 7 wurde aus einem Bereich gewählt, der größtenteils stromaufwärts der *Pst* I-Schnittstelle bei 2305 bp liegt. Ein kleiner Teil ragt aber über diese hinaus und umfasst damit einen kurzen Teil des in EMSA I retardierten 0.2 kb-Fragments (2305-2520 bp), das bei eben dieser *Pst* I-Schnittstelle beginnt (Abb.9/C).

3.3.4 EMSA II (PCR 5/ PCR 7 + Gesamtprotein von p6)

In diesem EMSA geht es um die Abklärung der Bindungsfähigkeit von OP2. Es wurden zwei durch PCR gewonnene DNA-Fragmente (Abb. 12: PCR5, PCR7) verwendet. Das Fragment PCR 7 (Abb. 12) hat eine Länge von 314 bp (2001-2315 bp) und umfasst einen Bereich, der vor dem Beginn des Gens der 3 α -HSD liegt und OP2 (Abb. 10/11) nicht enthält. Das Fragment PCR 5 (Abb. 12) hat eine Länge von 309 bp (2305-2614 bp) und erstreckt sich in den Bereich von *hsdA* und enthält OP2 (2568-2577 bp, Abb.10/11). Dieser wurde, da er sich palindromisch zu der anderen 10 Nukleotide umfassenden Sequenz (935-944 bp, Abbildung 12) verhält und schon im EMSA I als mögliche Bindungsstelle aufgefallen ist (Abb. 9), als Bindungsbereich für denkbare Repressorsequenzen gesehen. Mit den Primern p1R/pCHR3 und pCHR1/pCHR2 wurden die neuen Fragmente generiert (Kap. 2.6.5).

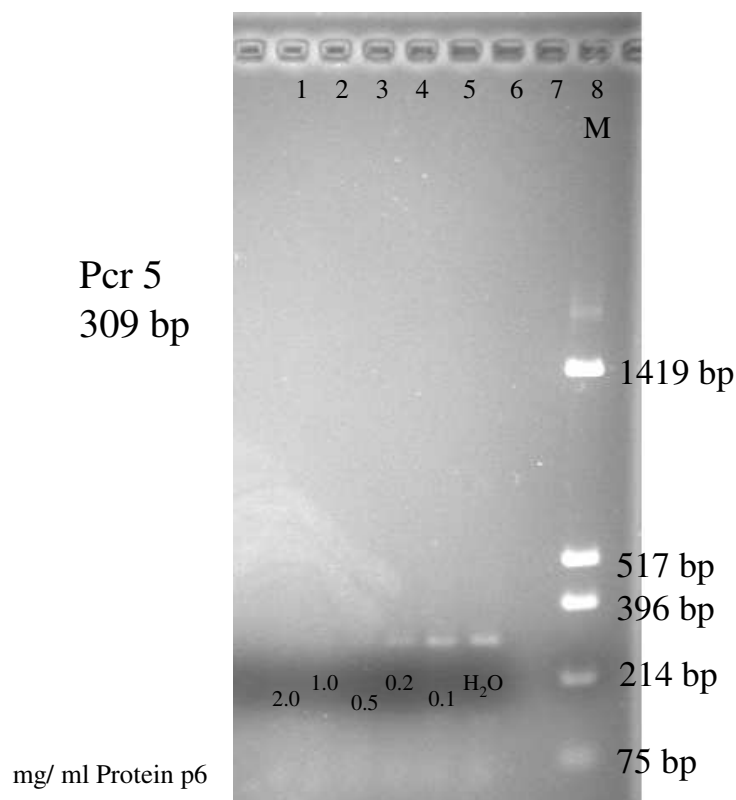


Abbildung 13: Agarosegelelektrophorese, das PCR-Fragment PCR 5 wurde mit Gesamtprotein vom Plasmid p6 in verschiedenen Proteinkonzentrationen inkubiert: Spur 1-6: PCR 5 + Gesamtprotein p6 (2.0 mg/ml – 0.1 mg/ml), H₂O. Spur 7: leer, Spur 8: Marker pUC 18 + Hinf I (Kap. 2.6.11). Der dazugehörige Southern-Blot wird in Abb. 14 gezeigt.

In Abb. 13 sieht man zunächst die Agarosegelelektrophorese von PCR 5 inkubiert mit Gesamtprotein von p6, wobei verschiedene Verdünnungen verwendet wurden (2.0 mg/ml, 1.0 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.1 mg/ml). Ebenso wurde mit PCR 7 verfahren, PCR 7 ist nicht abgebildet. Für die DNA-DNA-Hybridisierung wurde ein mit Digoxigenin markiertes ca. 0.5 kb langes DNA-Fragment verwendet, das sich von der *Xma* I-Schnittstelle bei 2001 bp bis zur *Avr* II-Schnittstelle bei 2520 bp erstreckt und so die möglichen Bindungsbereiche einschließt. Der verwendete Marker wurde durch Verdau von dem Vektor pUC18 (Material und Methoden, Abb.6) mit dem Restriktionsenzym *Hinf*I gewonnen. Es entstehen sechs Fragmente folgender Länge: 65 bp, 75 bp, 214 bp, 396 bp, 517 bp und 1419 bp. Die Inkubationszeit wurde auf 5 min verkürzt, um der Zerstörung von DNA durch die ubiquitär vorhandene DNase entgegenzuwirken. In den Spuren 1-6 ist PCR 5 aufgetragen. Spur 8 zeigt den mitgeführten Marker. Es fällt auf, dass die DNA-Fragmente, die mit höheren Konzentrationen von Protein inkubiert wurden, nicht deutlich sichtbar sind.

Abb.14 zeigt den nach der Agarosegelelektrophorese durchgeführten Southern Blot. Es ist das Fragment PCR 5 (Abb. 12) abgebildet, das mit Protein des Plasmids p6 inkubiert wurde. Es kommt zu einer Retardierung der DNA-Banden bei höherer Proteinkonzentration. Der Nachweis erfolgte mittels Chemolumineszenz. Wie oben schon erwähnt, enthält das Fragment PCR 5, an das hier im EMSA II Protein von p6 gebunden hat, die Sequenz OP2 und erstreckt sich noch 262 bp weiter stromaufwärts (Abb.12). Das DNA-Fragment PCR 7 liegt weiter stromaufwärts als PCR 5 (Abb. 12). Es zeigte keinen Bandshift. Die Daten sind nicht gezeigt. Es lässt sich also festhalten, dass es eine Bindungsregion auf der DNA im Bereich zwischen 2305 bp und 2614 bp gibt (PCR 5). In der Kontrolle wurden PCR 5 und PCR 7 mit Protein des Leerplasmids puC18 inkubiert. Hier war kein Bandshift nachzuweisen.

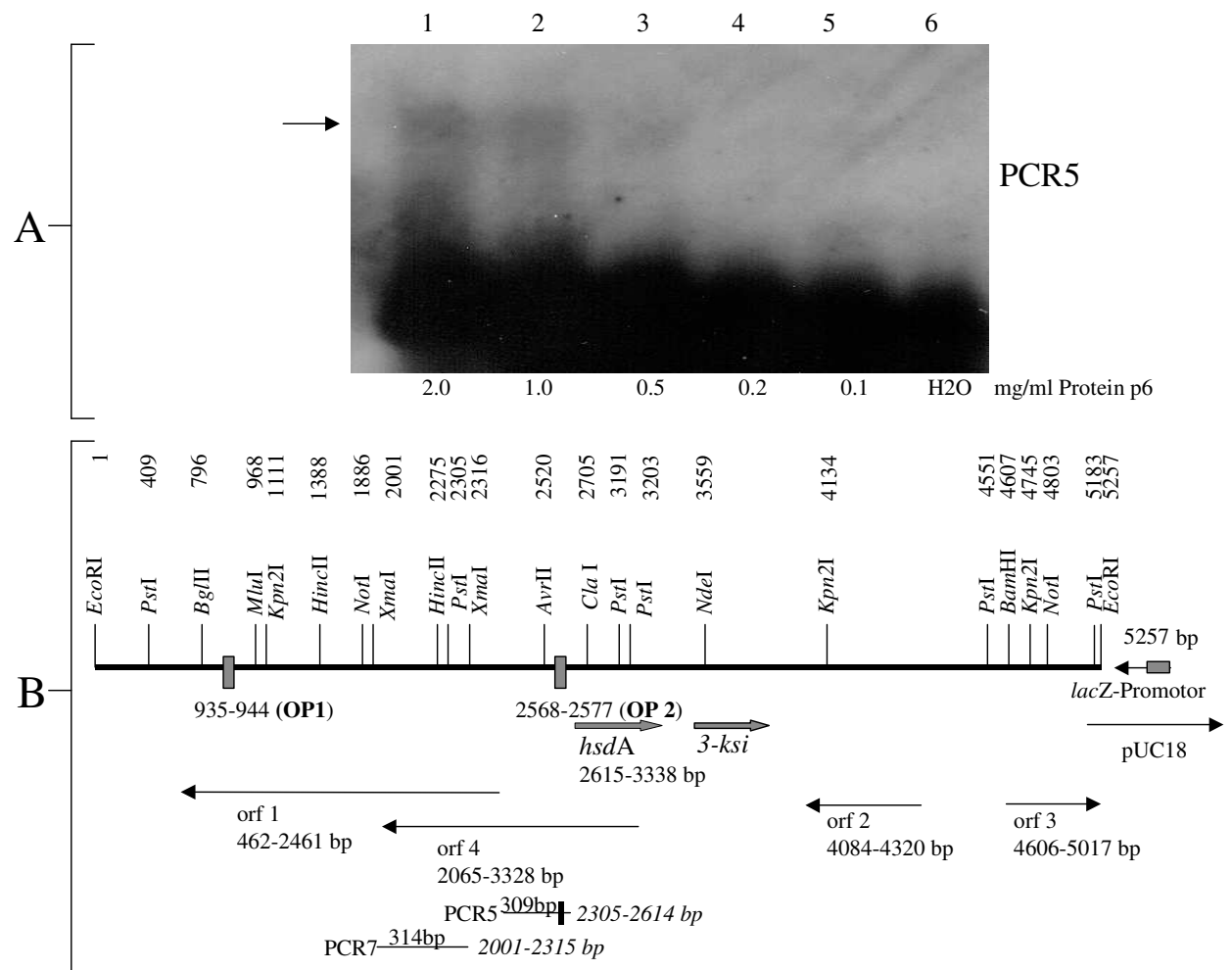


Abb.14: Southern Blot des EMSA II

- A) Spur 1-5: PCR 5 + Protein des Plasmids p6 in verschiedenen Konzentrationen (2.0–0.1 mg/ml Protein), Spur 6: PCR 5 + H₂O, Bandshift: schwarzer Pfeil. Daten von PCR7 nicht gezeigt
- B) Bekannte DNA-Sequenz (p6) und Restriktionsenzym, orf 1- 4, sowie PCR 5 und PCR 7 schematisch. PCR 5 enthält die Sequenz des OP2, PCR 7 enthält keine der homologen Sequenzen.

3.3.5 EMSA III (PCR 4 + Gesamtprotein von p6)

In diesem EMSA geht es um die Abklärung der Bindungsfähigkeit von OP1. Um die Bindungsaktivität der 10nt-Sequenz zu überprüfen, die sich im Bereich von 935-944 bp befindet und palindromisch zu der schon erklärten 10nt-Sequenz im Bereich von 2568-2577 bp ist, wurde ein DNA-Fragment (PCR 4) generiert, das eine Länge von 201 bp (781-982 bp) aufweist und den zu untersuchenden Teil einschließt (Abb. 12).

Das Fragment PCR 4 wurde mit Protein des Plasmids p6 (Abb. 8) inkubiert. Die Proteinkonzentration war absteigend von 2.0 mg/ml, 1.0 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.2 mg/ml und H₂O. Für die DNA-DNA-Hybridisierung wurde das gleiche PCR-Fragment (PCR4) mit Digoxigenin markiert. Die Proben wurden 15 min bei 37°C inkubiert. Abb. 15 zeigt den entstandenen Southern-Blot. Man erkennt einen deutlichen Bandshift bei der höchsten Proteinkonzentration, schwächere dagegen bei den niedrigeren Konzentrationen. Der Nachweis erfolgte mit der Chemolumineszenz-Reaktion.

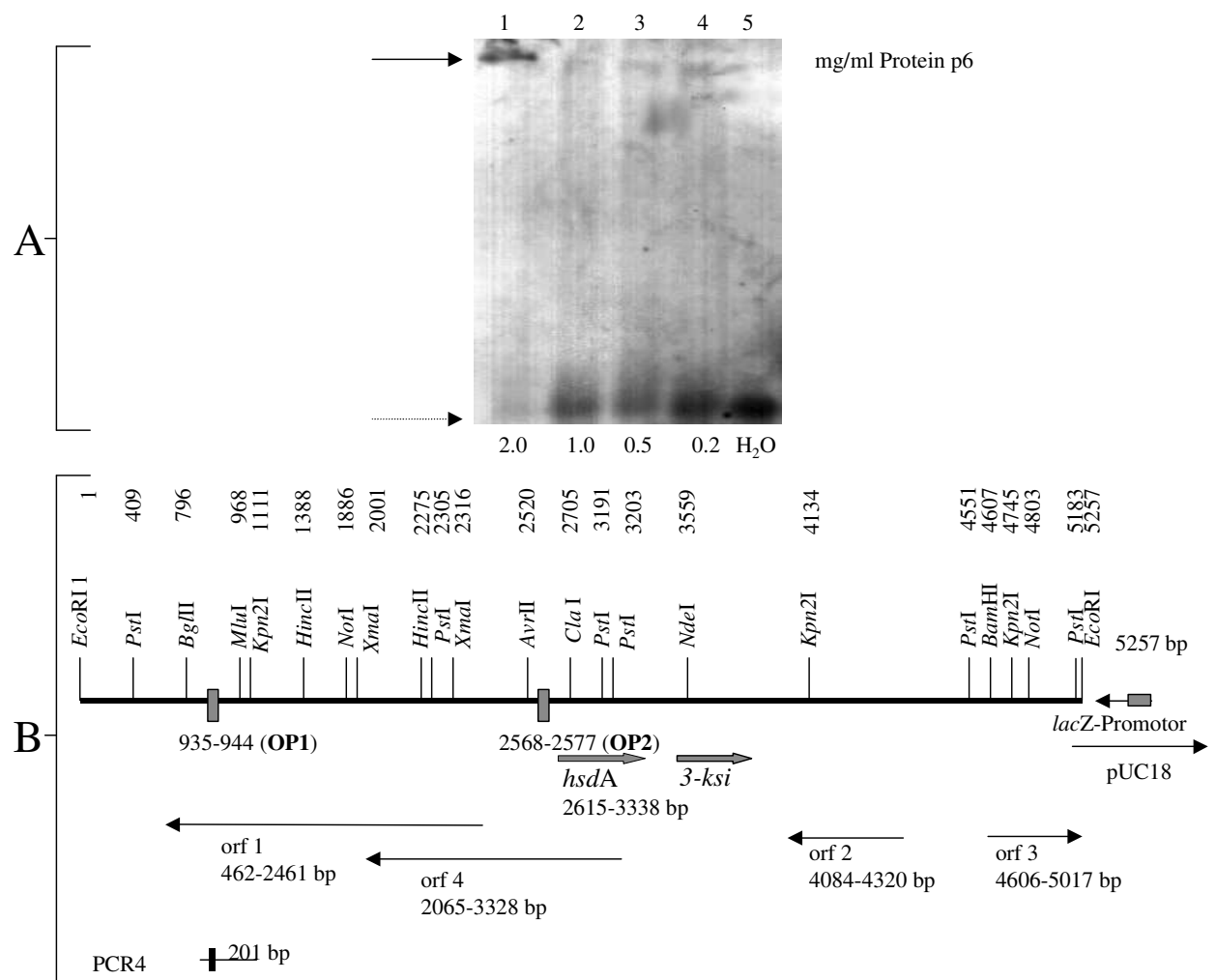


Abb. 15: Southern Blot des EMSA III

- A) PCR 4 + Protein p6, gestrichelter schwarzer Pfeil/ schwarzer Pfeil: Bandshift bei einer Konzentration von 2.0 mg/ml Protein
- B) Bekannter DNA-Strang (p6) und Restriktionsenzyme, orf 1-4, PCR 4

Wie schon erwähnt, enthält das Fragment PCR 4, an das hier im EMSA III Protein von p6 gebunden hat, die Sequenz von OP1. Es kann festgehalten werden, dass die DNA-

Sequenz von p6 zwischen 781-982 bp (PCR 4, Abb. 12, Abb. 15) eine Bindungsregion für ein oder mehrere Repressorproteine aufweisen könnte. In der Kontrolle wurde PCR4 mit Protein des Leerplasmids pUC18 inkubiert. Hier war kein Bandshift nachzuweisen.

3.4 Suche nach möglichen Repressorproteinen für die 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase

Nachdem nun zwei mögliche Operatorregionen für die 3 α -HSD mit Hilfe von EMSA eingegrenzt werden konnten, wird im folgenden auf die Suche nach möglichen Gensequenzen, die für Repressorproteine für die 3 α -HSD codieren, eingegangen. Bei den unter den Kapiteln 3.2, 3.3.4 und 3.3.5 dargestellten EMSA wurde jeweils Gesamtprotein, das aus p6 (Abb.8) gewonnen wurde, als Proteinkomponente verwendet. Hier konnte also noch keine weitere Spezifizierung der Genabschnitte auf p6 hinsichtlich eines bzw. mehrerer Repressoren gemacht werden. Es wurden verschiedene Deletionsmutanten, ausgehend von p6, hergestellt, die jeweils verschiedene Gensequenzen mit möglichen für Repressoren codierende Abschnitte enthalten.

3.4.1 Plasmide, die zur Gewinnung von Protein für nachfolgende EMSA generiert wurden

Für die folgenden EMSA wurde Gesamtprotein, das aus den in Abb. 16 und 17 gezeigten Plasmiden gewonnen wurde, benötigt.

3.4.1.1 Plasmide, kloniert in pUC 18

Abbildung 16/A zeigt das schon bekannte 5257 bp *EcoRI*-Fragment (p6) kloniert in den Vektor pUC18 (Abb. 6). Wie oben schon erklärt, wurde zuerst Protein von p6 (Abbildung 16/B) verwendet, welches die gesamte gewählte Gensequenz enthält. Hier konnte Bindungsaktivität nachgewiesen werden (EMSA I, Kap. 3.2, EMSA II, Kap. 3.3.4, EMSA III, Kap. 3.3.5). Nun sollten die für Repressoren codierenden Sequenzen näher eingegrenzt werden. p6NP1 und p6N4 (Abbildung 16/B) dienten zur Überprüfung des Abschnitts stromabwärts von *hsdA*. Das Insert von p6N4 umfasste den Sequenzbereich von der *NdeI*-Schnittstelle (3559bp) bis zur *EcoRI*-Schnittstelle (5252 bp). Die oben schon erwähnten orf 2 und orf 3 waren in ihrer vollen Länge enthalten. Das Insert von p6NP1 erstreckte sich von 3559-5252 bp (*NdeI*–*EcoRI*) mit Ausnahme des Bereichs 4607-5183 bp. Das heißt, dass nur die Gensequenz von orf 2, ebenso wie

bei p6N4, enthalten war. Die ausgenommene Sequenz enthält den offenen Leserahmen orf 3. Dieser sollte verglichen zu p6N4 als Störfaktor ausgeschlossen sein. Als Negativkontrolle wurde Protein vom reinen Vektor pUC18 verwendet.

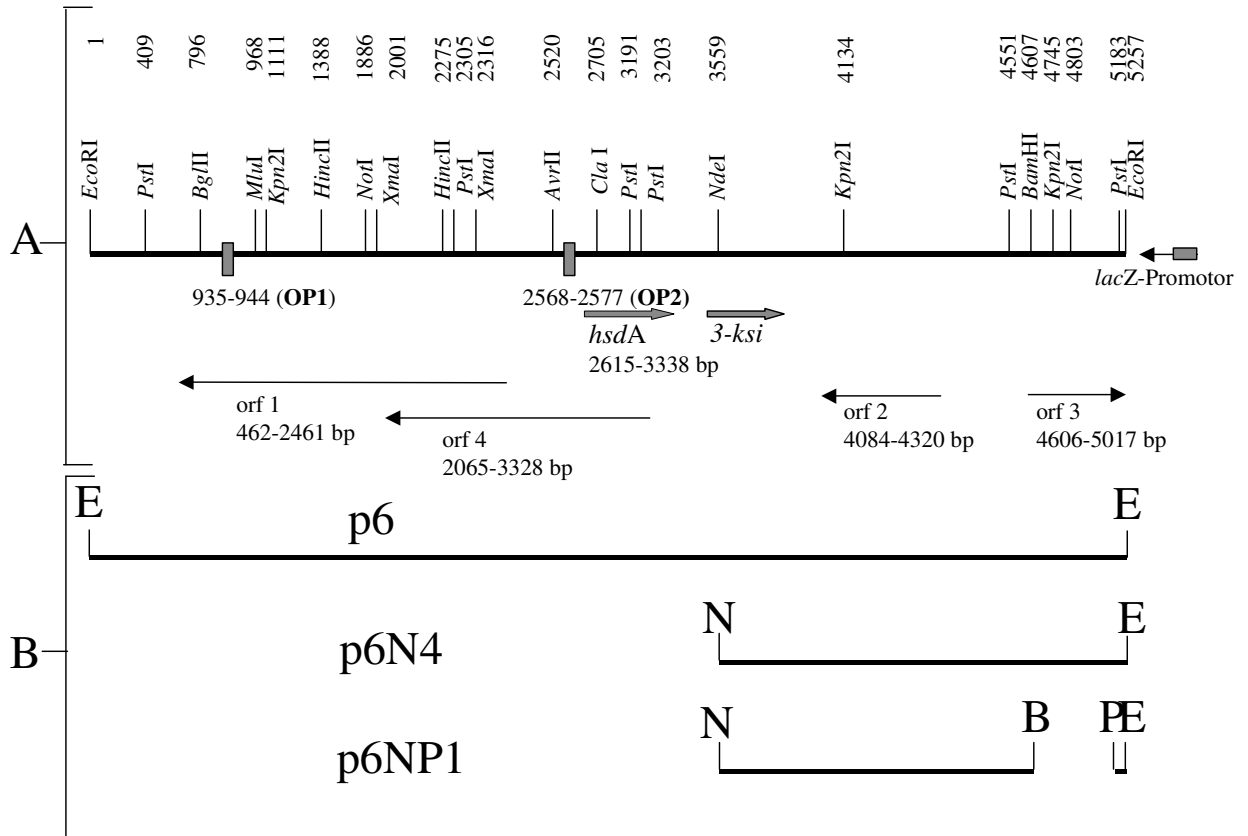


Abb.16: Plasmide, kloniert in pUC18

- A) Bekannter DNA-Strang (p6) und Restriktionsenzyme
 B) p6 und zwei verschiedene Deletionsmutanten (p6N4, p6NP1), p6N4 enthält orf 2 und orf 3, p6NP1 enthält nur orf 2

3.4.1.2 Plasmide, kloniert in pK 18

Abb.17 zeigt die verwendeten Plasmide, die in pK18 (Abb. 6) kloniert wurden. Abb. 17/ A zeigt den schon mehrfach gezeigten DNA-Strang, der dem Insert von p6 entspricht. pKAN10 (Abbildung 17/B) enthält ein relativ kleines Insert (2520-3559 bp), das den größten Teil der Gensequenz des orf 4 (orf4: 2065–3328 bp, pKAN10: 2520-3328 bp) umfasst, der mit *hsdA* überlappt. Würde der orf 4 für ein Repressorprotein kodieren, würde es sich bei diesem Plasmid um die N-terminale Gensequenz von 808 Basenpaaren, d.h. einer Größe von 269 Aminosäuren, handeln. pKCN2 erstreckt sich zwischen der *ClaI*-Schnittstelle und der *NdeI*-Schnittstelle (2705-3359 bp). Es enthält

nur kurze Sequenzen des orf 4 (orf 4: 2065–3328 bp, pKCN2: 2705–3328 bp). Das würde 623 bp, d.h. etwa 207 Aminosäuren, entsprechen. pK17 (Insert: 3203–3559 bp, Abbildung 17/B) enthält eine kurze Teilsequenz des orf 4 (orf4: 2065–3328 bp, pK17: 3203–3328 bp), was einer Länge von 124 bp, d.h. nur 41 Aminosäuren, entsprechen würde. Mit den Proteinen, die aus der Extraktion mit pKAN10, pKCN2 und pK17 entstanden sind, sollte die Bindungsfähigkeit des orf 4 überprüft werden, da dieser auch eng mit der Sequenz der 3 α -HSD verknüpft ist und dort vielleicht auch der Repressor liegen könnte.

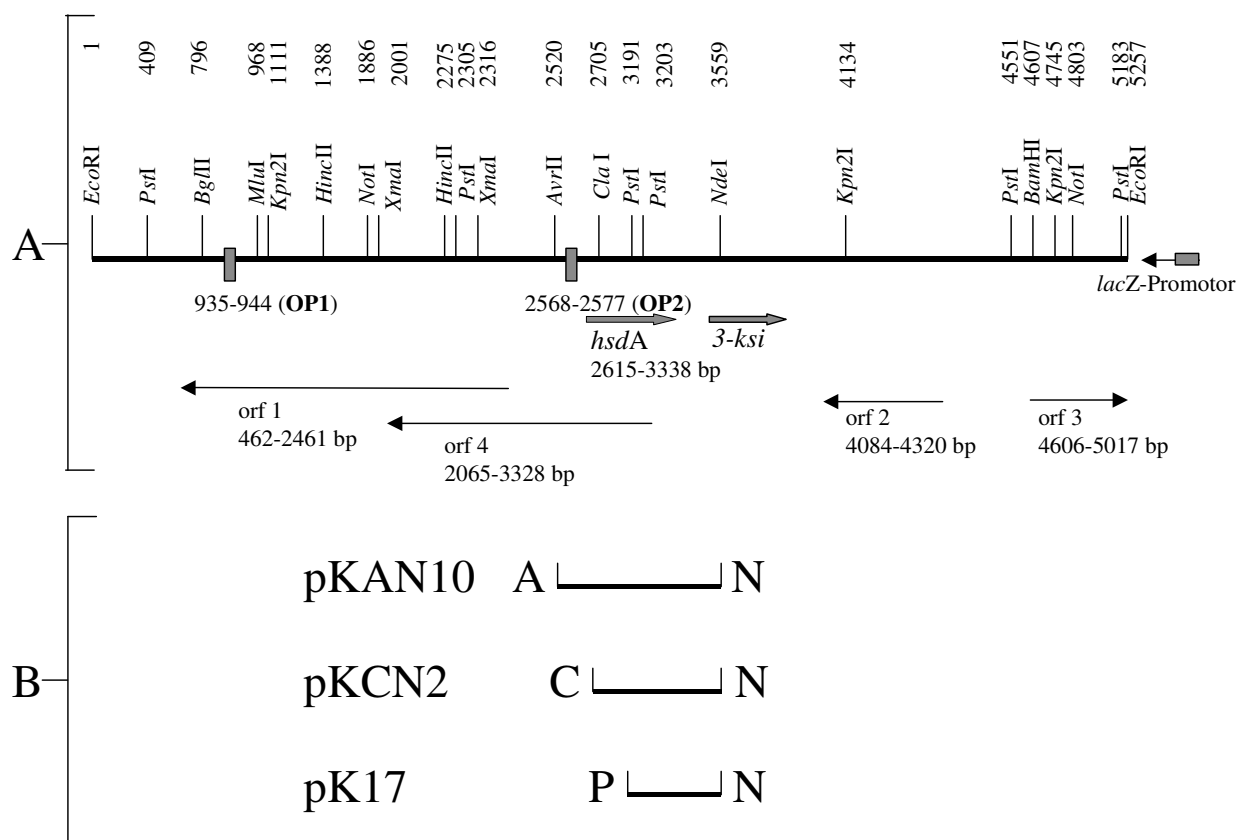


Abb. 17: Plasmide kloniert in pK18

- A) Bekanntster DNA-Strang (p6) und Restriktionsenzyme
 B) Deletionsmutanten ausgehend von p6 (pKAN10, pKCN2, pK17) in verschiedener Länge, die jeweils verschieden lange Sequenzen von orf 4 enthalten.

3.4.2 Untersuchung von orf 4 auf Repressoraktivität bei der Regulation der 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase

Nachdem, wie oben beschrieben, in den vorhergehenden EMSA die Regionen, welche die Operatorsequenzen enthalten, näher eingegrenzt werden konnten (EMSA I–III, Kap. 3.2, 3.3.4, 3.3.5) und die zwei palindromischen 10nt-Sequenzen (OP1 und OP2, Abb. 18) sehr wahrscheinlich Bindungsregionen für mögliche Repressoren sind, werden hier nun die Ergebnisse zur Eingrenzung der für einen bzw. mehrere Repressoren codierenden Sequenzen dargestellt. Zuerst wird der orf 4 weiter untersucht, der sich von 2.065 – 3.328 kb erstreckt und in Abb. 18 blau markiert ist.

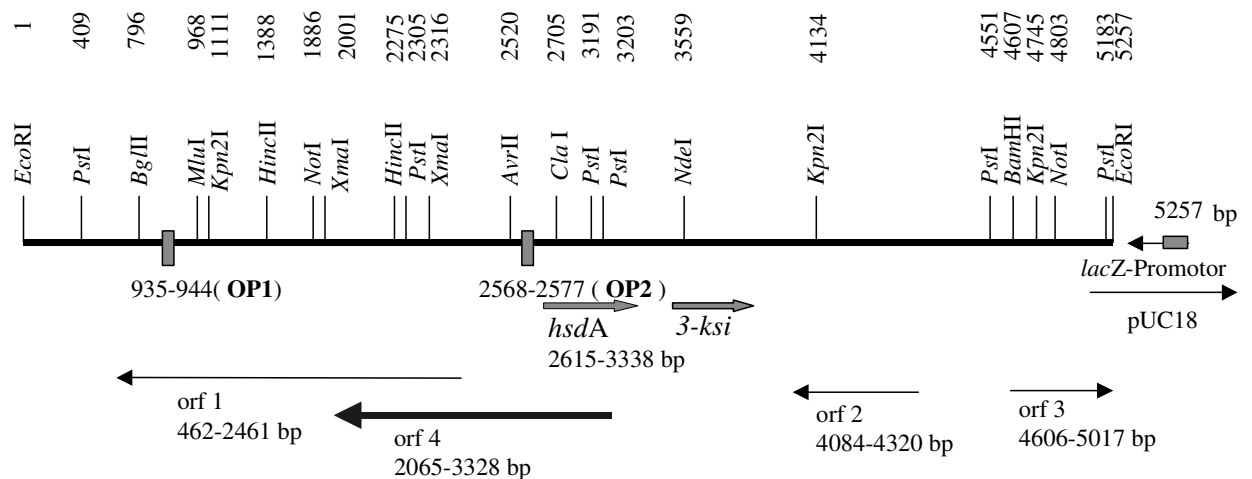


Abb.18: p6 , Restriktionsenzyme, *hsdA*, 3-ksi, orf 1- 4, orf 4 ist fett und blau markiert, er überlappt mit *hsdA* und wird entgegengesetzt des Enzyms abgelesen

orf 4 überlappt mit *hsdA*, wird aber entgegengesetzt abgelesen. In den folgenden EMSA wird orf 4 mit Hilfe der unter Kap. 3.4.1.2 erklärten Plasmide, die Deletionsmutanten von p6 sind (pKAN10, pkCN2, pK17), auf seine Bindungsaktivität im Sinne eines Repressorproteins untersucht.

3.4.2.1 EMSA IV (PCR 5 + Protein von pKAN10)

Es wurde das schon weiter oben beschriebene 309 bp DNA-Fragment (2305 bp-2614 bp, PCR5, Abb.12, Abb.19) mit Gesamtprotein aus pKAN10 inkubiert, um hier die Bindungsfähigkeit des orf 4 mit der palindromischen Sequenz OP2 (2568-2577 bp) zu überprüfen (Abb. 19). Die Proteinverdünnung variiert von 1 µg/µl bis 0.1 µg/µl. Die Inkubationszeit von DNA und Protein beträgt 15 min bei 37°C. Die Gelelektrophorese wurde mit einem 1.5% Agarosegel bei 80mA durchgeführt. PCR 5 wurde radioaktiv mit [γ^{32} p-]ATP markiert.

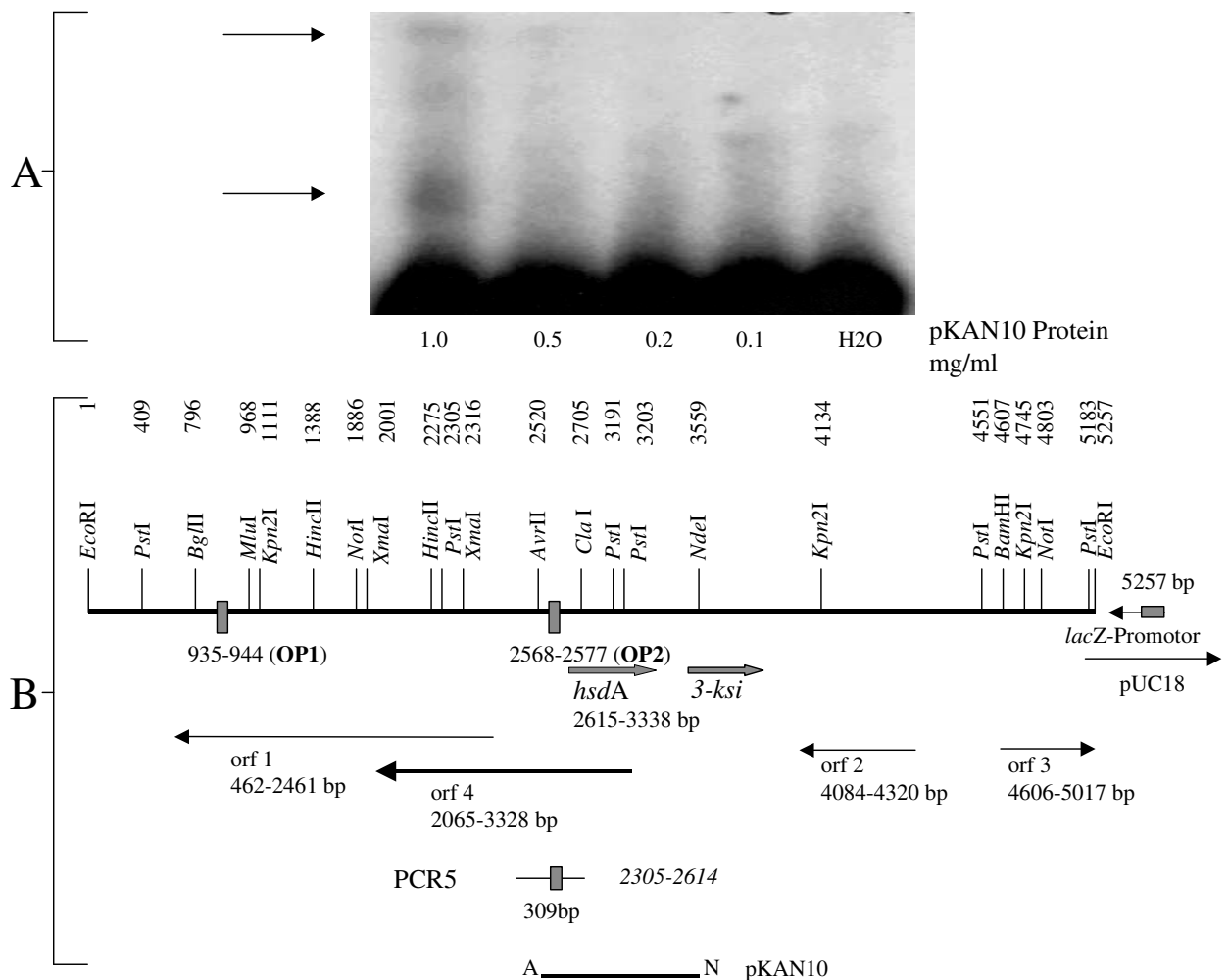


Abb. 19: Southern Blot des EMSA IV

- A) PCR 5 + Protein pKAN10, die retardierten Banden sind mit zwei schwarzen Pfeilen markiert
- B) Bekannter DNA-Strang (p6) und Restriktionsenzyme, orf 4 und pKAN10 sind fett markiert.

Es erscheinen im Southern Blot (Abb. 19) zwei retardierte Banden. Wie schon erwähnt, enthält PCR 5 die Sequenz OP2, die in vorhergehenden EMSA schon Bindungsaktivität mit Protein von p6 gezeigt hat (Kap. 3.2, 3.3.4, 3.3.5). pKAN10 enthält 808 bp des orf 4, das entspricht etwa 2/3 des gesamten orf 4. Es bleibt zu diskutieren, warum hier zwei geshiftete Banden liegen. Eventuell lässt sich daraus ein Hinweis über die Konformation des Repressorproteins ziehen. Weiterhin wurde in den folgenden EMSA untersucht, inwieweit kürzere Sequenzen des orf 4 ebenfalls Bindungsaktivität haben.

3.4.2.2 EMSA V (PCR 1/ PCR 3 + Protein von pKAN10)

Hier folgte ein weiterer EMSA mit Protein, gewonnen aus pKAN10. Die PCR-Fragmente wurden variiert. Es wurde PCR 1 (Abb. 12) verwendet, das mit einer Länge von 194 bp die Sequenz OP1 enthält (Abb.20), sowie PCR 3 (Abb. 12), das 91 bp vor OP2 endet (Abb. 20). Es sollte überprüft werden, ob auch eine nach stromaufwärts verlängerte Region Bindungsaktivität zeigt, nachdem bereits eine Proteinbindung an die DNA-Region um und an OP2 sichtbar gemacht werden konnte (z.B. Kap. 3.2, 3.3.3, 3.3.4).

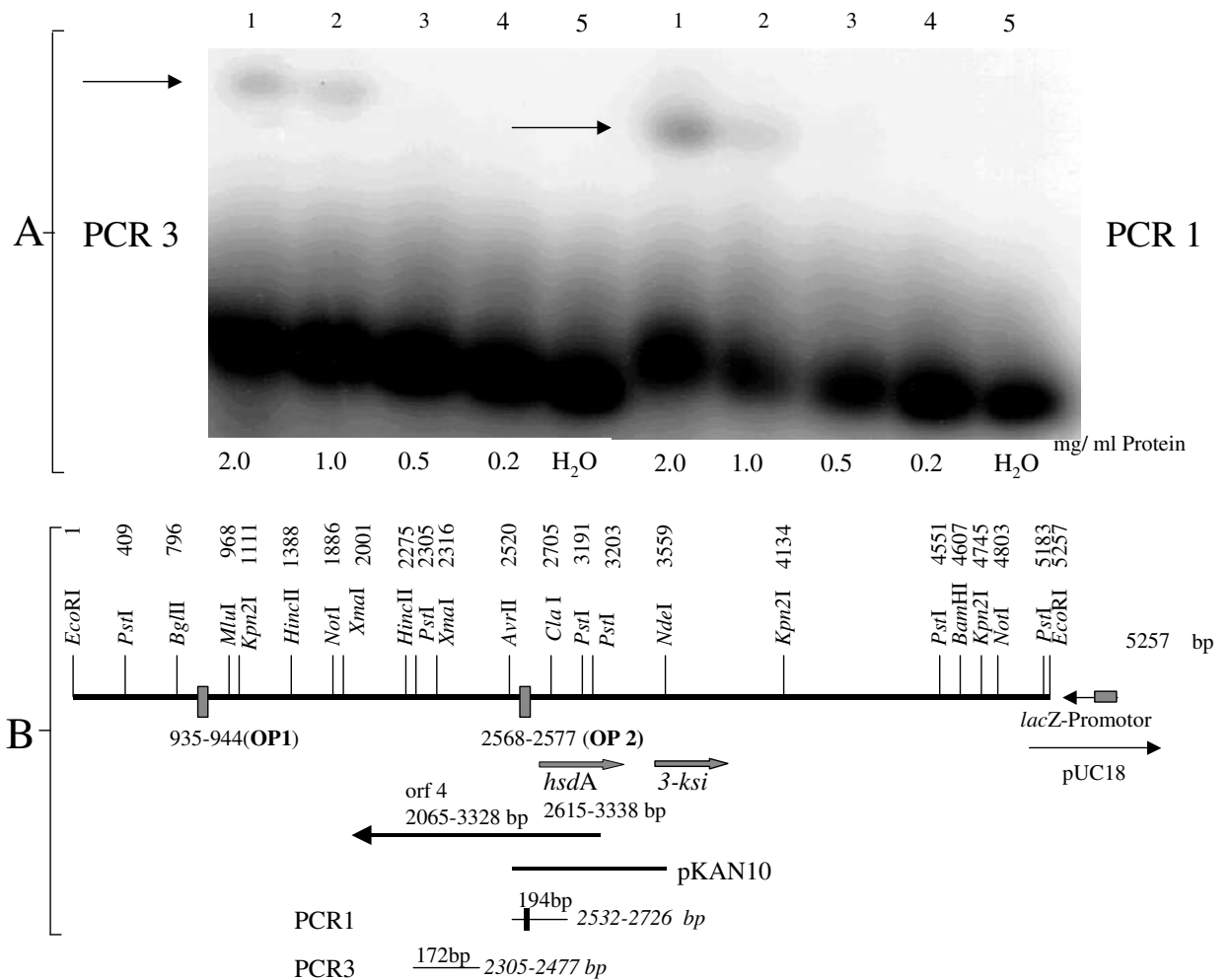


Abb. 20: Southern Blot des EMSA V

- A) PCR 1/ PCR 3 (markiert mit [γ^{32} p]-ATP) + Protein von pKAN10 in verschiedenen Proteinkonzentrationen (2.0–0.2 mg/ml Protein), jeweils Spur 1-4, und H₂O, Bandshifts sind mit schwarzen Pfeilen markiert
- B) bekannter DNA-Strang (p6), orf 4 und pKAN10 fett markiert, PCR 1 und PCR 3, PCR 1 enthält die Sequenz OP2

Es konnte, wie unter EMSA IV, eine Bindungsaktivität des Proteins von pKAN10 (Abb. 20, Abb. 17, Kap. 3.4.1.2) nachgewiesen werden und zwar für PCR 1, ein Fragment mit der schon bekannten Sequenz OP2 (Abb. 20), aber auch für PCR 3, das benachbart zu der palindromischen Sequenz liegt.

3.4.2.3 EMSA VI (PCR 6 + pK17)

Hier wurde ein sehr kleiner Teil von orf 4 (2065 – 3328 bp, Abb.21) auf seine Bindungsaktivität überprüft und zwar mit Hilfe des Plasmids pK17 (Abb. 17/ Kap. 3.4.1.2, Abb. 21).

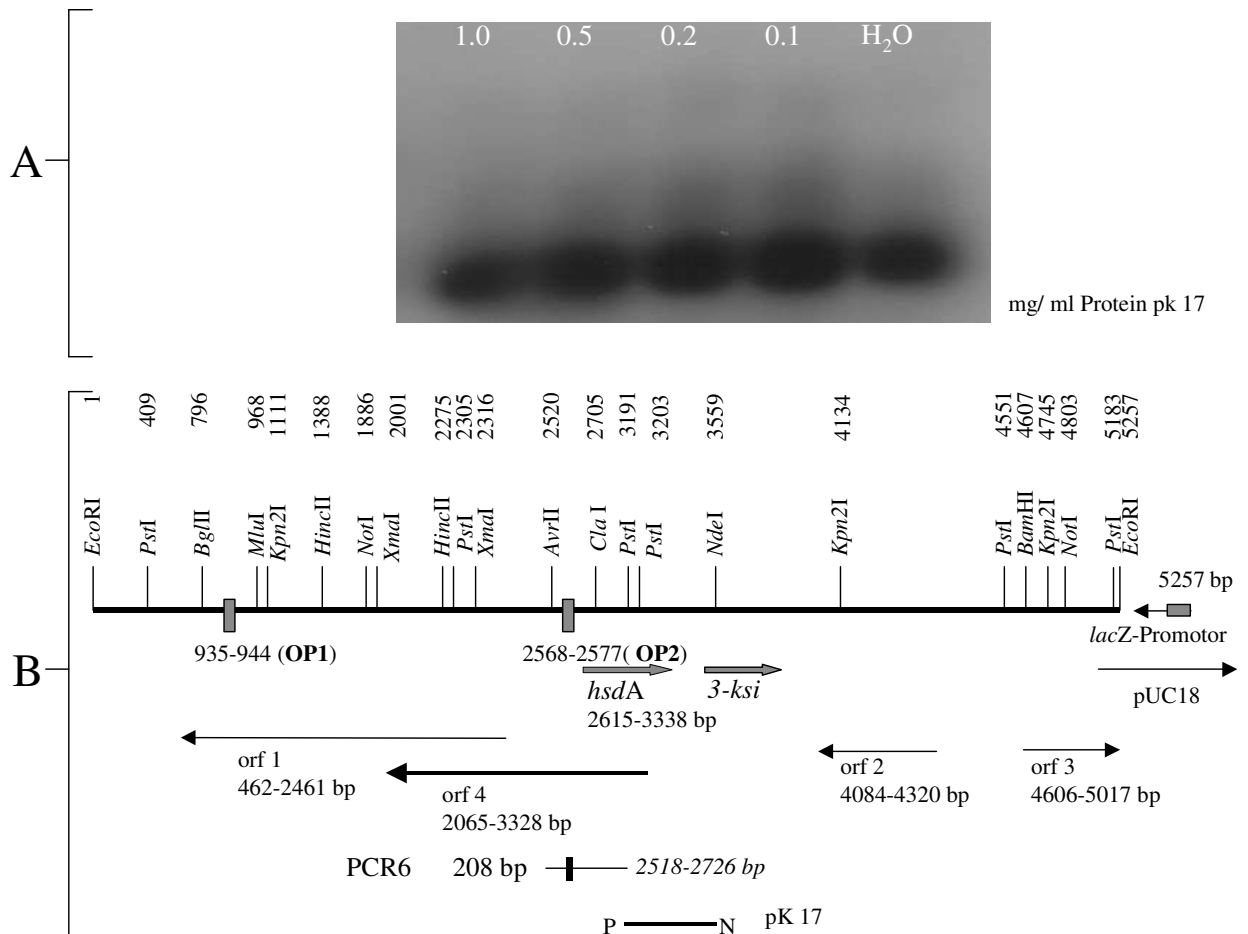


Abb.21: Southern Blot des EMSA VI

- A) Bild des Southern Blots PCR 6 + Protein von pK17, es ist kein Bandshift zu sehen.
- B) Bekannter DNA-Strang (p6) und Restriktionsenzyme, orf 4 und pK17 fett markiert

Das verwendete PCR-Fragment entspricht in großen Teilen dem auch verwendeten Fragment PCR 5. Es ist etwas kürzer, enthält aber ebenfalls die Sequenz OP2. Das Plasmid pK17 erstreckt sich, wie unter Kap. 3.4.1.2 beschrieben von der *Pst* I-Schnittstelle bei 3.191 kb bis zur *Nde* I-Schnittstelle bei 3.559 kb. Es überschneidet sich

nur im Bereich von 3.191 – 3.328 kb mit orf 4, d.h mit 124 bp, was nur 41 Aminosäuren am N-Terminus entsprechen würde. Hier wurde kein Bandshift verzeichnet. Eventuell ist der gewählte Bereich des orf 4 zu, kurz um Bindungsaktivität zu entwickeln. Ebenso könnte auch das Fragment PCR 6 keine Bindungsaktivität haben. Im folgenden EMSA wurde pKCN2 als Plasmid gewählt, dessen Insert einen etwas größeren Teil des orf 4 umfasst, aber dennoch nicht so lang ist wie pKAN10 (Abb. 17, Kap. 3.4.1.2).

3.4.2.4 EMSA VII (PCR 2 + Protein von pKCN2, pKAN10, p6NP1)

Hier wurde ebenfalls ein Teil von orf 4 (2.065-3.328 kb) auf seine Repressorfähigkeit überprüft (Abb. 22).

Das Fragment PCR 2, das unter Kapitel 3.3.3 schon näher erklärt wurde, enthält die Sequenz OP2 nicht und erstreckt sich von 2.305–2.539 kb, d.h. nahe an OP2 heran. Da mit dem ersten orientierenden EMSA (EMSA I, Kap. 3.2.) und mit dem EMSA V (Kap. 3.4.2.2) eine längere bindungsfähige Gensequenz als nur die kurze Gensequenz des OP2 gesehen wurde, wurde das Fragment PCR 2 verwendet.

pKCN2 erstreckt sich zwischen der *Cla*I-Schnittstelle und der *Nde*I-Schnittstelle (2.705-3.359 kb). Es enthält nur kurze Sequenzen des orf 4 (orf 4: 2.065–3.328 kb, pKCN2: 2.705-3.328 kb). Das würde 623 bp, d.h. etwa 207, Aminosäuren am N-Terminus des Repressorproteins entsprechen. Es wurde für Protein des Plasmids pKAN10 zuvor schon Bindungsaktivität gesehen, somit steht es als Kontrolle in diesem Versuch. p6NP1 enthält den orf 2 (nicht abgebildet). Auf die Bindungsfähigkeit von Proteinen, die von orf 2 und orf 3 generiert werden, wird später noch eingegangen (Kap. 3.4.3).

Es konnte bei Inkubation von PCR 2 mit Protein der Plasmiden pKCN2 und p6NP1 kein Bandshift gesehen werden, bei Inkubation mit Protein von pKAN10 konnte bei der höchsten Proteinkonzentration (1.0 mg/ml Protein, Spur 1, Mitte in Abb. 22) ein leichte Bandenretardierung gesehen werden (Abbildung 22, folgende Seite).

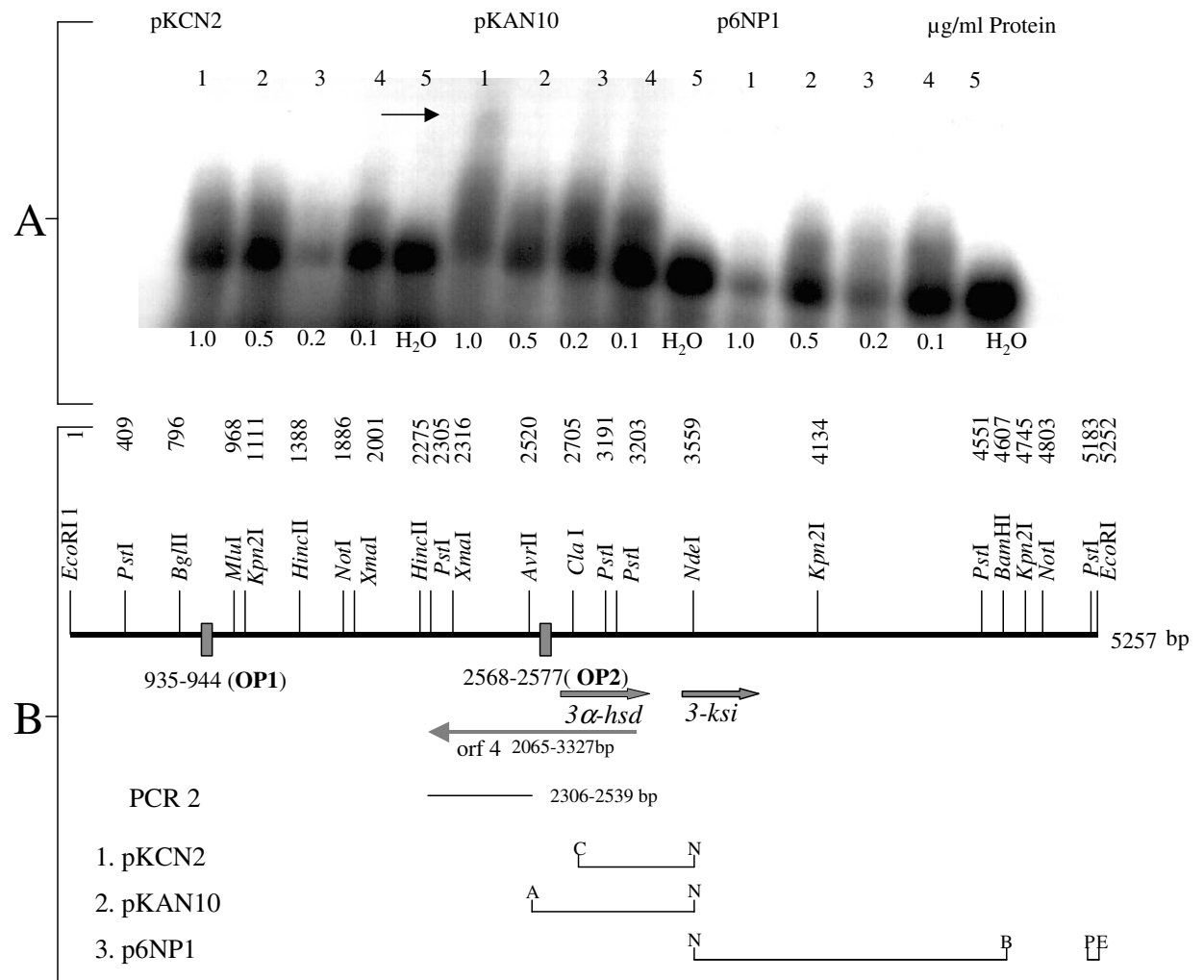


Abb. 22: Southern Blot des EMSA VII

- A) PCR 2 inkubiert mit Protein von den verschiedenen Plasmiden pKCN2 (links, Spur 1-5), pKAN10 (Mitte, Spur 1-5), p6NP1 (rechts, Spur 1-5) in unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (1.0–0.1 mg/ml Protein) und H₂O. Es ist ein leichter Bandshift bei PCR 2 und pKAN10 zu sehen (schwarzer Pfeil).
- B) DNA-Strang p6, orf 4 ist grau und fett markiert, verwendete Plasmide und PCR-Fragment PCR 2 unterhalb sichtbar.

3.4.3 Untersuchung von orf 2 und orf 3 auf seine Repressoraktivität bei der Regulation der 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase

Nachdem in den vorhergehenden EMSA (EMSA IV, EMSA V) eine Bindungsaktivität für orf 4 nachgewiesen werden konnte, wurden in den folgenden EMSA die orf 2 und orf 3, die unter Kapitel 3.1 schon näher beschrieben wurden, hinsichtlich ihrer Repressorexpression untersucht, da man eventuell von mehreren Repressorproteinen für die Regulation der 3 α -HSD ausgehen kann. Der von orf 4 kodierte Repressor wird im folgenden als Repressor A bezeichnet. Der orf 2 erstreckt sich von 4084-4320 bp, und der orf 3 von 4606–5017 bp (Abb.23, blau markiert). Orf 2 wird entgegen der 3 α -HSD abgelesen, orf 3 in Richtung des Enzyms.

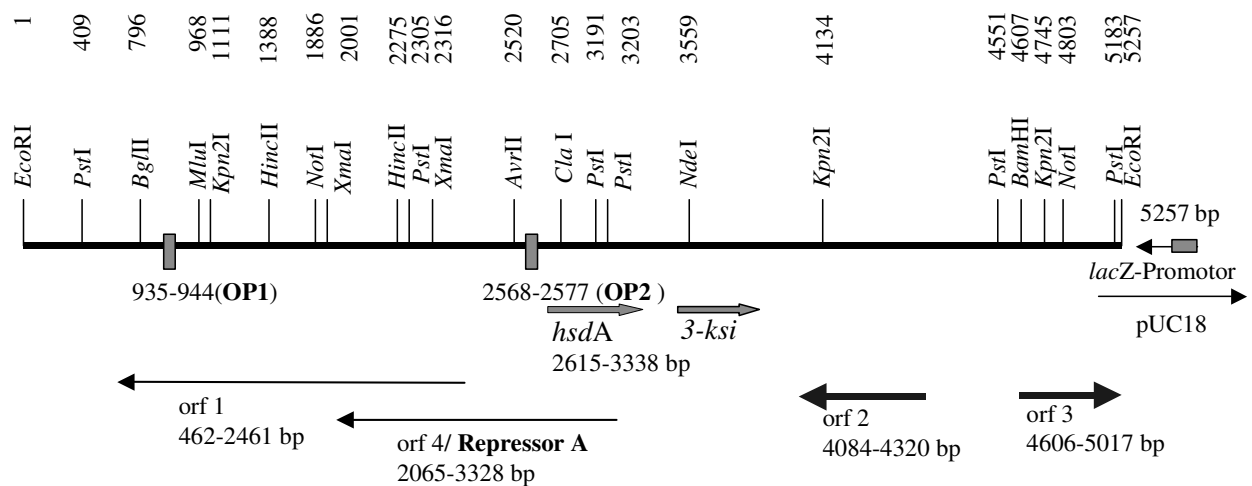


Abb. 23: p6 mit verschiedenen Restriktionsenzymchnittstellen, *hsdA*, *3-ksi*, orf 1-4, orf 2 und orf 3 sind blau markiert. orf 4 entspricht Repressor A (fett).

In den folgenden EMSA wurden die orf 2 und orf 3 mit Hilfe der unter Kapitel 3.4.1.1 schon beschriebenen Plasmide p6N4 und p6NP1 auf ihre Bindungsfähigkeit untersucht.

3.4.3.1 EMSA VIII (PCR5 + Protein p6/ Protein p6N4)

Mit Hilfe von p6N4, einer Deletionsmutante von p6 (Kap. 3.4.1.1, Abb.16), wurden zunächst die Bindungsaktivitäten von orf 2 und orf 3 gemeinsam überprüft. Als DNA-Fragment wurde PCR 5 (Kap. 3.3.3, Abb. 12) verwendet, welches die Sequenz OP2 enthält.

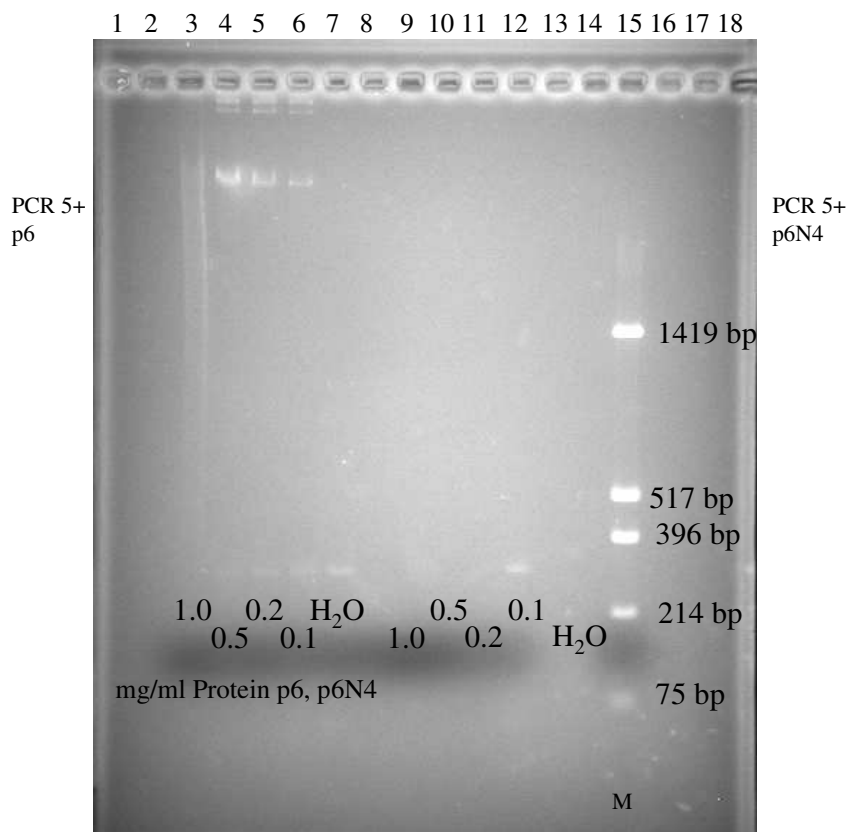


Abb. 24: Agarosegelelektrophorese, Spur 3-7: PCR 5 + Protein p6, Spur 9-13: PCR 5 + p6N4, Spur 15: Marker (pUC18 + *Hinf* I), Protein in angegebener Konzentration

Abb. 24 zeigt die Agarosegelelektrophorese des EMSA. Links auf dem Photo sieht man PCR 5 mit Protein von p6, auf der rechten Seite PCR 5 mit Protein von p6N4. In jeweils absteigender Proteinkonzentration (1.0 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.1 mg/ml, H₂O) wurden die Proben für 35 min bei 37 °C inkubiert. PCR 5 wurde radioaktiv mit [γ^{32} P]-ATP markiert. Ganz rechts (Spur 15) sieht man den verwendeten Marker: pUC18, verdaut mit dem Restriktionsenzym *Hinf* I. Schon in der Agarosegelelektrophorese erkennt man in der Kombination PCR 5 und Gesamtprotein des Plasmids p6 eine

Bandenretention bei den höheren Proteinkonzentrationen (Spur 3-6). In Spur 3 erscheint kein Bandshift. Es ist möglich, dass hier bei hoher Proteinkonzentration die DNA durch im Protein enthaltene DNase verdaut wurde.

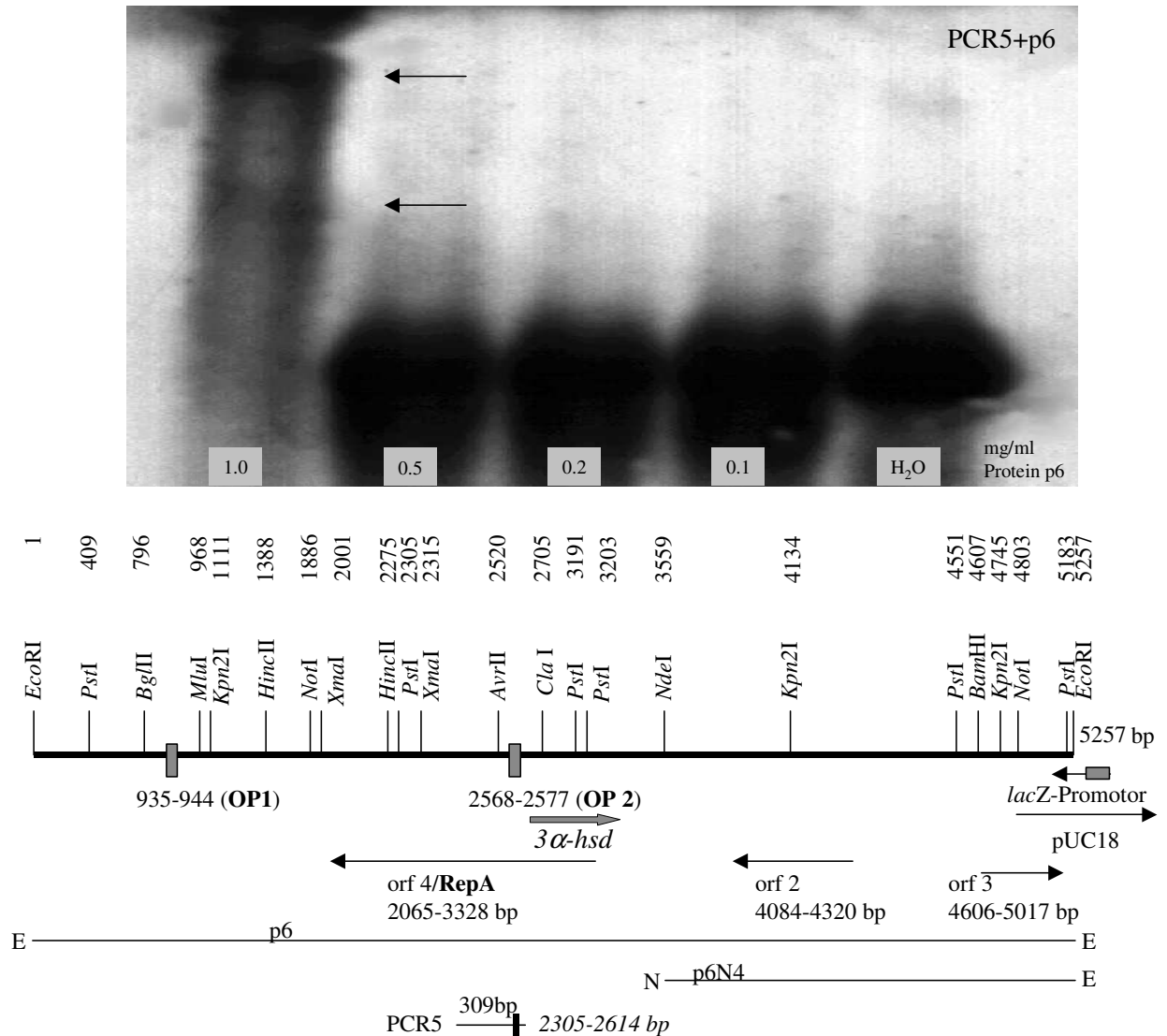


Abb. 25: Southern Blot des EMSA VIII, PCR 5 + Protein p6

Oben: Bild des Southern Blots, retardierte Banden sind durch zwei schwarze Pfeile markiert

Unten: Bekannter DNA-Strang (p6) und Restriktionsenzyme. Verwendetes PCR-Fragment: PCR 5, verwendetes Protein des Plasmids p6 und des Plasmids p6N4 (Daten nicht gezeigt).

Im Southern Blot (Abb. 25) erkennt man bei der Proteinkonzentration von 1.0 mg/ml zwei retardierte Banden, als Hinweis auf eine erfolgte DNA-Protein-Bindung. Der Southern-Blot mit PCR 5 und Protein von p6N4, das für orf 2 und orf 3 steht, ergab

keinen Bandshift (Daten nicht gezeigt). Hier konnte also lediglich ein Bandshift für PCR 5 mit Protein von p6 gesehen werden, wie auch schon im EMSA II (Abb. 14). Auffällig war, dass hier wieder eine Doppelbande auftrat (Abb. 25, schwarze Pfeile). Eine Doppelbande war auch schon im EMSA IV (PCR 5 + Protein pKAN10, Abb. 19) zu sehen. Das könnte Aufschluss über die Konformation des Repressors geben.

Hier konnte also eine Protein-DNA-Bindung ausgehend von orf 2 oder orf 3 ausgeschlossen werden, während die Bindung von einem Protein, das wahrscheinlich durch orf 4 bzw. Repressor A kodiert wird, bestätigt werden konnte.

3.4.3.2 EMSA IX (PCR 1/ PCR 2/ PCR 3 + p6NP1)

Hier wurde zur Kontrolle des EMSA VIII orf 2 isoliert und auf Bindungsaktivität überprüft.

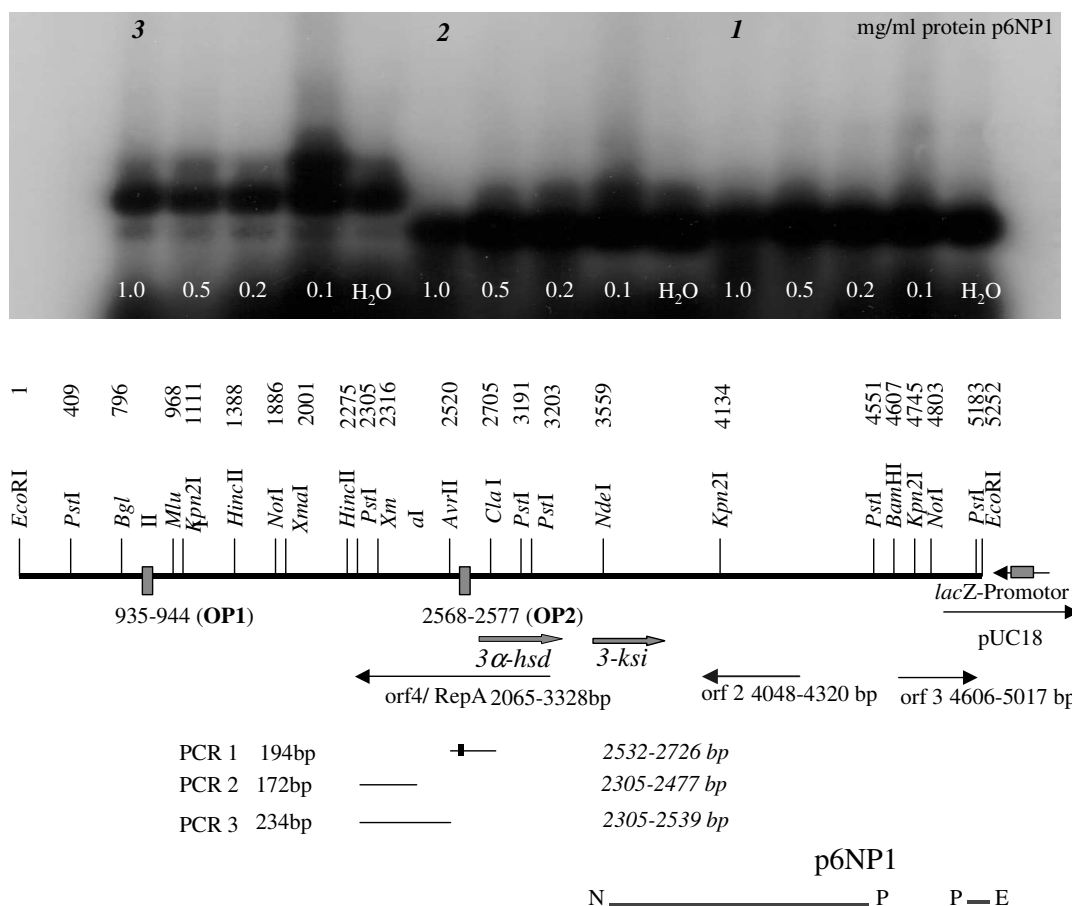


Abb. 26: Southern Blot des EMSA IX, PCR 1/ PCR 2/ PCR 3 + Protein p6NP1
Oben: Bild des Southern Blots, kein Bandshift
Unten: Bekannter DNA-Strang (p6) und Restriktionsenzyme, orf 2 und p6NP1 blau markiert. Verwendete PCR-Fragmente: PCR1, PCR2, PCR3.

Es wurden verschiedene PCR-Fragmente verwendet, die unter Kapitel 3.3.3 (Abb. 12) schon näher erklärt wurden. PCR 1 enthält die Sequenz OP2, PCR 2 und PCR 3 nicht (Abb. 26, Abb. 12). PCR 2 und PCR 3 unterscheiden sich in ihrer Länge. PCR 3 reicht näher an die palindromische Sequenz heran (Abb. 26) Die oben beschriebenen DNA-Fragmente werden mit Gesamtprotein inkubiert, das von dem p6-Derivat p6NP1 gewonnen wurde. Die Proteinkonzentration wurden zwischen 1.0 mg/ml und 0.1 mg/ml gewählt. Die Proben wurden 15 min bei 37°C inkubiert. Verwendung der radioaktiv

markierten Fragmente PCR 1, PCR 2 und PCR 3. p6NP1, das unter Kapitel 3.4.1.1 (Abb. 16) schon näher beschrieben wurde, enthält weder den orf 3, noch orf 4 bzw. Repressor A. Es enthält ein 1061 bp langes Insert, das nur die Sequenz des orf 2 umfasst.

Hier konnte für p6NP1 keine Bindungsaktivität anhand eines Bandshift festgestellt werden (Abb. 26). Zusammenfassend kann man also festhalten, dass nur orf 4 bzw. Repressor A für ein an die DNA bindendes Repressorprotein codiert, nicht aber orf 2 und orf 3. orf 4, der Repressor A entspricht, umfasst eine Sequenz von 1263 bp, d.h. 420 Aminosäuren.

3.5 Bestimmung der Aktivität der 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase mit Hilfe der HPLC

Im folgenden werden die erhaltenen Ergebnisse zur Aktivitätsmessung der 3 α -HSD hinsichtlich ihres Repressor-Operator-Verhaltens vorgestellt. Mit Hilfe der HPLC kann nach einem zeitlich definierten Substratumsatz die Menge an gebildetem Produkt pro Zeiteinheit, bezogen auf die eingesetzte Proteinmenge, berechnet werden. Die Substratumsätze von Metyrapon wurden aus den Chromatogrammen der jeweiligen HPLC-Messung ermittelt und die spezifische Aktivität wie folgt berechnet:

$$\text{Spez. Akt.} = \frac{\text{Substratumsatz } (\Delta \text{ Area}) \times \text{Messempfindlichkeit} \times 10}{\text{Faktor} \times \text{Inkubationszeit [min]} \times \text{Proteinkonzentration [mg/ml]}}$$

Die spezifische Aktivität enthält damit die Einheit nmol/mg/min. Der Faktor stellt die Steigerung der jeweiligen Eichkurve dar. Δ Area ergibt sich aus der Differenz der integrierten Peakflächen von Substrat und Metabolit.

In Abbildung 27/A wird erneut p6 gezeigt, das, wie schon beschrieben, in dieser Arbeitsgruppe beim Screenen einer *C. testosteroni*-Gen-Bank mit einer homologen Oligonukleotid-Sonde für das 3 α -HSD-Gen (*hsdA*) im Southern-Blot erkannt, kloniert und sequenziert wurde. Abb. 27/B zeigt verschiedene Deletionsmutanten, ausgehend von dem Plasmid p6, mit denen die spezifische Aktivitätsmessung erfolgte. Im folgenden werden die deletierten Plasmide näher erklärt.

In Abbildung 27/A ist das betreffende DNA-Fragment (Insert von p6) mit verschiedenen Schnittstellen diverser Restriktionsenzyme zu sehen, sowie *hsdA*, *3-ksi* und verschiedene offene Leserahmen (orf 1-4). Wie schon zuvor erklärt (Kap. 3.1), erstreckt sich orf 1 von 0.462–2.461 kb, orf 2 von 4.084–4.320 kb, orf 3 von 4.606–5.017 kb und orf 4 von 2.065–3.328 kb. orf 1, orf 2 und orf 4 liegen entgegen der Richtung von *hsdA*, orf 3 in Richtung von *hsdA*. Die Plasmide (Abb. 27/B) werden in ihren Eigenschaften kurz erklärt. Das schon bekannte p6 enthält alle vier der schon

mehrfach erklärten offenen Leserahmen (orf 1-4), die Sequenz für die 3 α -HSD und die zwei schon erwähnten pallindromischen Sequenzen OP1 und OP2 (Abb. 27/A). p6B4 enthält ebenfalls alle Strukturen bis auf den orf 3 (Abb. 27/A). p6N11 enthält nur orf 1 und orf 4, *hsdA* ist vollständig erhalten, OP1 und OP2 sind erhalten (Abb. 27/B). p6KP4 enthält einen sehr kurzen Teil des orf 2 (50 bp), einen Teil des orf 1, den kompletten orf 4 und op 2, während op 1 fehlt. pAX1 enthält orf 2 und orf 3, orf 4 ist nur zum Teil erhalten, orf 1 fehlt, wie auch OP1 (alles Abb. 27).

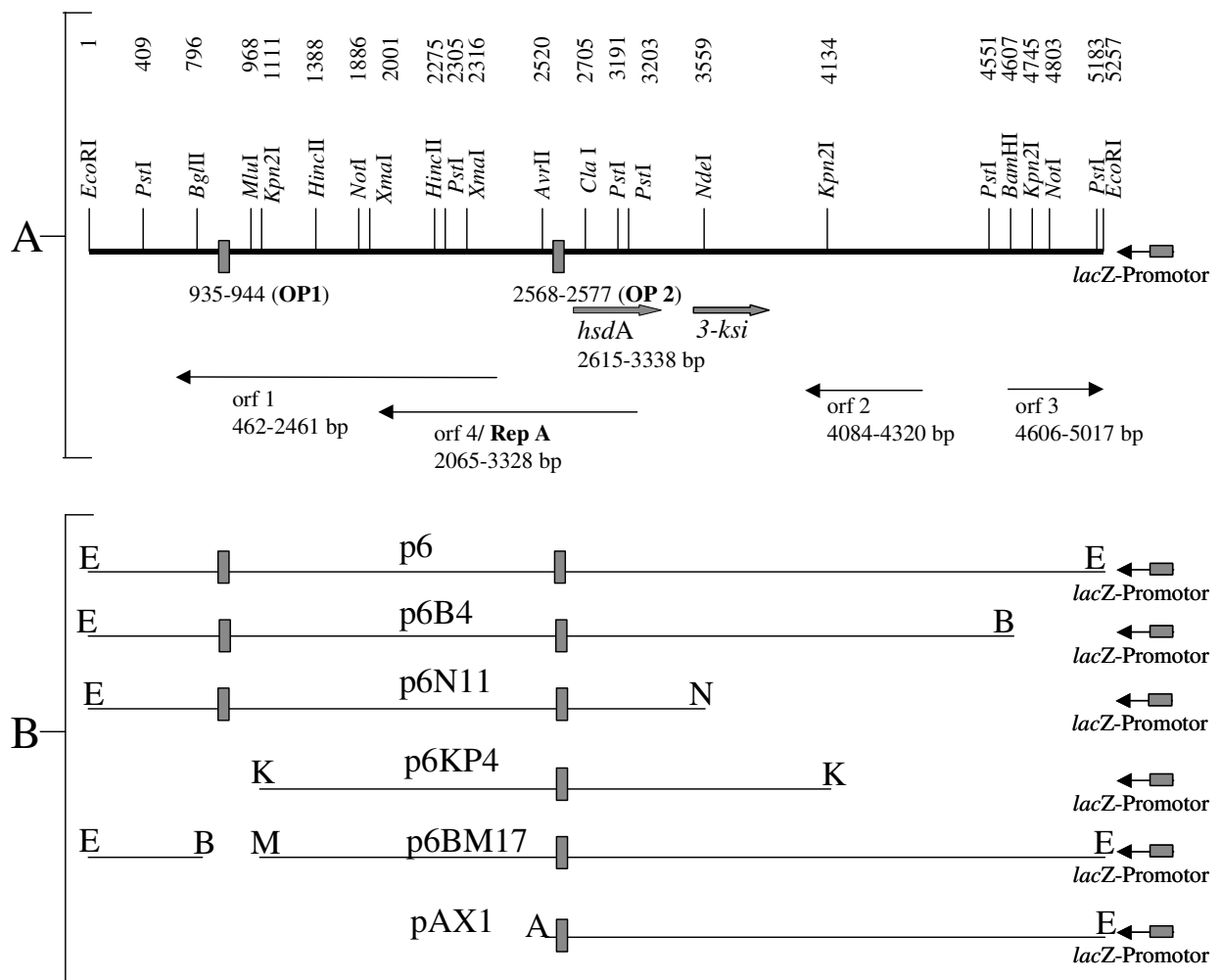
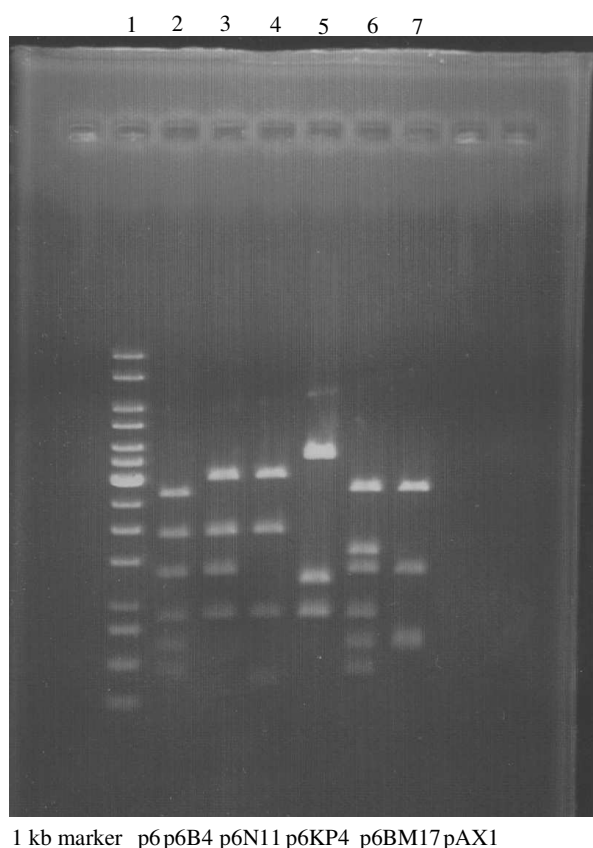


Abb. 27: Plasmide, die zur Aktivitätsmessung der 3 α -HSD generiert wurden

- A) Bekannter DNA-Strang (p6) und Restriktionsenzyme
 B) einzelne Deletionsmutanten von p6: p6B4, p6N11, p6KP4, p6BM17, pAX1

Alle Plasmide aus Abb. 27/B, auf die später noch genauer eingegangen wird, sind in pUC18 kloniert, der *LacZ*-Promotor befindet sich in Richtung des orf 4 bzw. Repressors A, d.h. in entgegengesetzter Richtung der 3 α -HSD. Zuerst wurden die Plasmide durch

Restriktionsverdau mit *Pst* I überprüft (Abb. 28). Die Größe der einzelnen entstehenden Fragmente ist für jedes Plasmid seitlich angegeben. Man erkennt in Spur 1 den mitgeführten 1kb-Marker, Spur 2 zeigt das mit *Pst* I verdaute Plasmid p6, das nach dem Verdau sechs Banden (2.717 kb, 1.896 kb, 1.348 kb, 0.898 kb, 0.632 kb, 0.409 kb) zeigt. In den Spuren 2-7 erkennt man die durch Restriktionsverdau erhaltenen Banden der verschiedenen Deletionsmutanten (Abb. 28: p6B4, p6N11, p6KP4, p6BM17, pAX1).



Plasmide, generiert für die HPLC nach Restriktionsverdau mit *Pst* I

Spur 3: p6

1. 2.717 kb
2. 1.896 kb
3. 1.348 kb
4. 0.898 kb
5. 0.632 kb
6. 0.409 kb

Spur 4: p6B4

1. 3.057 kb
2. 1.896 kb
3. 1.348 kb
4. 0.898 kb
5. 0.075 kb

Spur 5: p6N11

1. 3.057 kb
2. 1.896 kb
3. 0.896 kb
4. 0.368 kb

Spur 6: p6KP4

1. 3.593 kb
2. 1.218 kb
3. 0.898 kb

Spur 7: p6BM17

1. 2.717 kb
2. 1.724 kb
3. 1.348 kb
4. 0.898 kb
5. 0.632 kb
6. 0.409 kb

Spur 8: pAX1

1. 2.717 kb
2. 1.348 kb
3. 0.706 kb
4. 0.632 kb

Abb. 28: Restriktionsverdau der für die HPLC verwendeten Plasmide mit *Pst* I, Spur 1: 1 kb Marker, Spur 1-7: p6, p6B4, p6N11, p6KP4, p6BM17, pAX1

Tabelle 2: Aktivität des Umsatzes von Metyrapon der für die HPLC verwendeten Plasmide in nmol /min/mg, M: Mittelwert, SD: Standardabweichung, n: Anzahl der Messungen pro Plasmid. Das Signifikanzniveau betrug $p < 0.01$.

Plasmide	M	+/- SD	n
p6	6.101	0.517	4
p6B4	3.601	0.961	4
p6N11	0.278	0.134	4
p6KP4	5.981	1.333	4
p6BM17	8.284	0.570	4
pAX1	17.284	1.939	4

Die Aktivitätsmessung der 3α -HSD mittels HPLC zeigt eine Grundaktivität von 6.101 nmol /min/mg bei p6 (Tab.2, Abb. 29). p6 enthält sowohl die nach den EMSA vermuteten Gensequenzen des orf 4 bzw. Repressors A, sowie die vermuteten Operatorsequenzen OP1 und OP2 (Abb. 27/A) der 3α -HSD. Es handelt sich also um eine Art Grundaktivität, da alle Regulationselemente vorhanden sind.

p6B4 zeigt eine um 50 % verminderte Aktivität (3.601 nmol/mg/min, Tab. 2, Abb. 29). Hier rückte der *LacZ*-Promotor näher an einen möglichen Repressor B, so konnte dieser verstärkt exprimiert werden und eine stärkere Repression ausüben.

Bei dem Plasmid p6N11 fehlt die Sequenz für orf 2 und orf 3. Man könnte eine steigende Aktivität für die 3α -HSD vermuten, wenn hier auch eine Sequenz für einen Repressor verborgen wäre. Dies konnte im EMSA allerdings nicht bestätigt werden (Kap. 3.4.3.1) Der *LacZ*-Promotor befindet sich allerdings direkt vor dem Transkriptionsstart des Repressor A, der hier stark exprimiert wird, die spezifische Aktivität der 3α -HSD sinkt um 96 % (0.278 nmol/mg/min, Tab. 2, Abb. 29).

Im Falle von p6KP4 wird auch Repressor A durch die Nähe des *LacZ*-Promotors zum Transkriptionsstart sehr stark abgelesen. Die spezifische Aktivität ist aber höher als bei p6N11. Man sieht, dass sie sich mit 5.981 nmol/mg/min (Tab. 2) kaum von der des Ausgangsplasmids p6 unterscheidet. Bei p6KP4 fehlt OP1, die Sequenz, von der im

EMSA III eine Bindungsaktivität im Sinne eines Operators nachgewiesen wurde. Bei p6BM17 konnte ein Aktivitätsanstieg um 38 % (8.284 nmol /mg/min, Tab. 2) gesehen werden. Dem Plasmid fehlt ebenfalls die kurze DNA-Sequenz im Bereich von 796-968 bp (OP1). Wir vermuten, dass, wie im EMSA III gezeigt, der Repressor bzw. die Repressoren nicht mehr suffizient binden können.

Der letzten Deletionsmutante pAX1 fehlt die Sequenz OP1 (Abb. 27/A). Vermutlich kann der Repressor bzw. die Repressoren keine DNA-Bindung eingehen. Der Repressor A ist außerdem in dieser Mutante nur teilweise enthalten. Eventuell wurde sein aktives Zentrum zerstört. Die spezifische Aktivität steigt um ca. 283 % (Tab.2, Abb. 29).

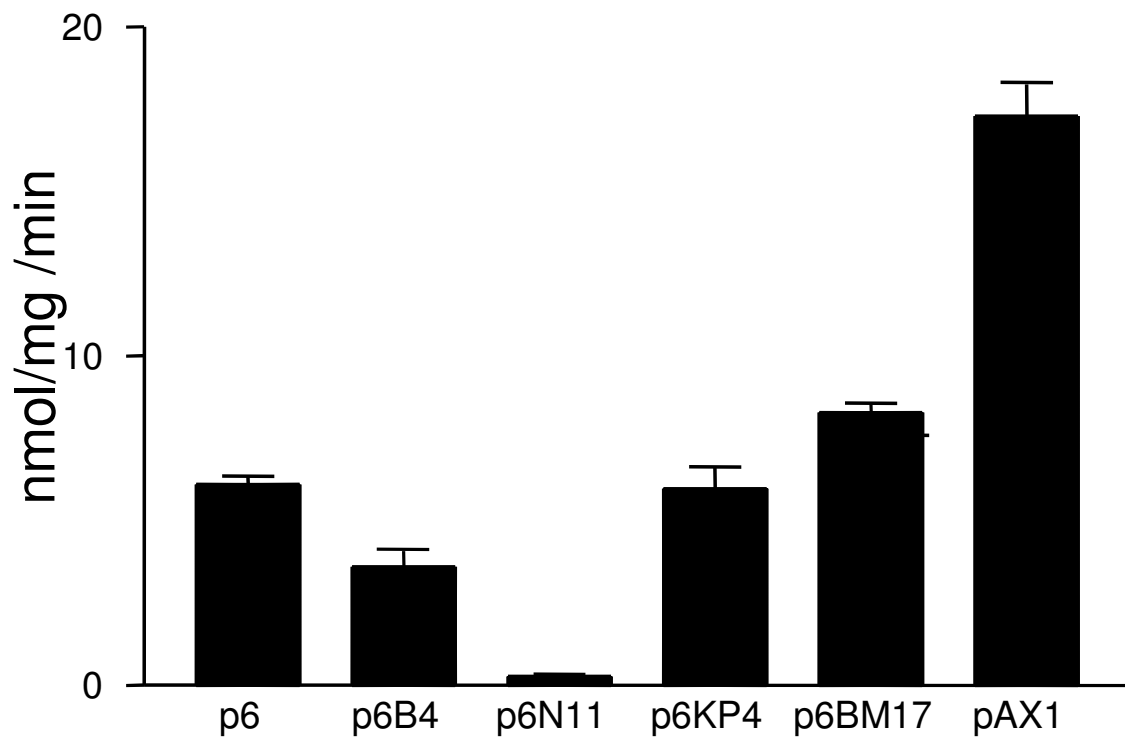


Abb. 29: graphische Darstellung der Aktivität der 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase beim Umsatz von Metyrapon bei den verschiedenen Plasmiden p6, p6B4, p6N11, p6KP4, p6BM17, pAX1 als Balkendiagramm in nmol/mg/min. Auf den einzelnen Balken ist die Standardabweichung zu sehen.

Diese Ergebnisse geben die gleichen Hinweise wie die Analysen mittels EMSA. orf 4 bzw. Repressor A (Abb. 27/A), der in entgegengesetzter Richtung zum 3 α -HSD-Gen abgelesen wird und dem im EMSA Bindungsfähigkeit an die DNA nachgewiesen werden konnte, kann auch in der Aktivitätsmessung seine repressorische Aufgabe

erfüllen. Ebenso scheinen die zwei palindromischen 10nt-Sequenzen (OP1 und OP2, Abb. 27/A) für die Repressorbindung von Bedeutung zu sein, wie auch im EMSA und in der HPLC deutlich wurde.

4 DISKUSSION

4.1 Diskussion der vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Identifizierung von Regulationsmechanismen der 3 α -HSD aus dem Bakterium *Comamonas testosteroni* ATCC 11996.

Die 3 α -HSD gehört zu einer Gruppe kataboler Enzyme, die in der Lage sind in Mikroorganismen wie *C. testosteroni* komplexe Kohlenwasserstoffverbindungen zu mineralisieren. Wie in der Einleitung beschrieben, ist die prokaryontische 3 α -HSD ein steroidmetabolisierendes Enzym, das bei Anwesenheit seines Substrates exprimiert wird (Talalay et Wang, 1955; Wacker et al., 1965; Watanabe et al., 1973). Diese bedarfsweise Expression steht unter der Kontrolle der Substrate selbst.

Für die Untersuchungen wurde ein schon für frühere Experimente verwendete 5.257 kb *EcoRI*-Fragment, das von chromosomaler DNA von *Comamonas testosteroni* isoliert wurde (Möbus et Maser, 1998), verwendet. Das Fragment enthält die Gensequenz für die 3 α -HSD (*hsdA*), die Gensequenz für ein weiteres am Steroidstoffwechsel beteiligtes Enzym, die 3-Ketosteroid-Isomerase (*3-ksi*), und verschiedene offene Leserahmen (orf 1-4) (Ergebnisse, Abb. 8).

In dieser Arbeit wurden verschiedene Genabschnitte auf dem oben beschriebenen DNA-Fragment auf ihre Fähigkeit bei der Regulation der 3 α -HSD im Sinne einer Operator-Repressorfunktion beteiligt zu sein, untersucht.

4.1.1 Methodik

Um Operator-Repressor-Wechselwirkungen für die 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase in *Comamonas testosteroni* näher zu untersuchen, wurde neben der Aktivitätsmessung mittels HPLC die Methode des „Electrophoretic mobility shift assay“ verwendet. Dieses Verfahren ist für quantitative Analysen von Protein-DNA-Wechselwirkungen gut

geeignet. Beim Mobilitätstest bestimmt man die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit eines nicht-radioaktiv oder radioaktiv markierten DNA-Fragments in Gegenwart oder Abwesenheit eines spezifisch an die DNA bindenden Proteins. Die Proteinbindung verringert die Beweglichkeit des DNA-Fragments. Dies führt zur Verschiebung des Fragments an eine andere Stelle der Autoradiographie (Yoshinaga et al., 1989). In unserem Fall wurden zuerst DNA-Sonden verwendet, die nicht-radioaktiv mit Digoxigenin markiert wurden. Hier wurde die Visualisierung der Banden einmal als Farbnachweis mittels X-Phosphat und NBT (Kap. 2.6.12.4) geführt und weiterhin als Chemoluminiszenznachweis mittels CSPD (Kap. 2.6.12.4). Ergebnisse mit dieser Methode sehen wir in Abbildung 9 (Farbnachweis) und in Abbildung 14 und 15 (Chemoluminiszenznachweis). Um die Sensitivität zu verbessern, wurde danach nur noch mit [$\gamma^{32}\text{p}$]-ATP radioaktiv markierten DNA-Sonden gearbeitet (alle folgenden Bandshift-Assays). Es wurde jeweils von den verschiedenen Plasmiden exprimiertes Gesamtprotein für die Ansätze des EMSA verwendet. Durch die Verunreinigung mit fremdem Protein war die Bildqualität der Southern Blots teilweise suboptimal.

Trotzdem konnten durch die verschiedenen Bandshift-Assays die Bindungsregionen für den Repressor bzw. die Repressoren der 3 α -HSD näher eingegrenzt werden, sowie die Sequenzen, die für die Repressorproteine codieren. In den folgenden Arbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Maser konnte Repressor A mittels His-tag-Säulen gereinigt und spezifische Antikörper gegen das Repressorprotein hergestellt werden (noch nicht publizierte Daten). Der nächste Schritt wird der spezifische Bindungsnachweis von Repressor A an OP1 und OP2 mittels Footprint-Analysen sein.

4.1.2 Diskussion zu den möglichen Operatorregionen der 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase

Wie im Ergebnisteil schon dargestellt, wurden zur Eingrenzung einer möglichen Operatorregion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Maser durch Computeranalysen zwei je 10 Nukleotide umfassende, palindromische Sequenzen auf dem Genabschnitt gefunden. Sie liegen in einem Abstand von 1.633 kb zueinander (OP1: 0.935-0.944 kb,

OP2: 2.568-2.577 kb, Abb.10). OP2 befindet sich 9 bp stromaufwärts des Promotors von *hsdA*. Der Transkriptionsstart von *hsdA* konnte 28 bp stromaufwärts vom Translationsstart identifiziert werden (Xiong et al., 2001). Die Promotorregion befindet sich innerhalb der 93 bp-Region stromaufwärts von *hsdA* (Xiong et al., 2001).

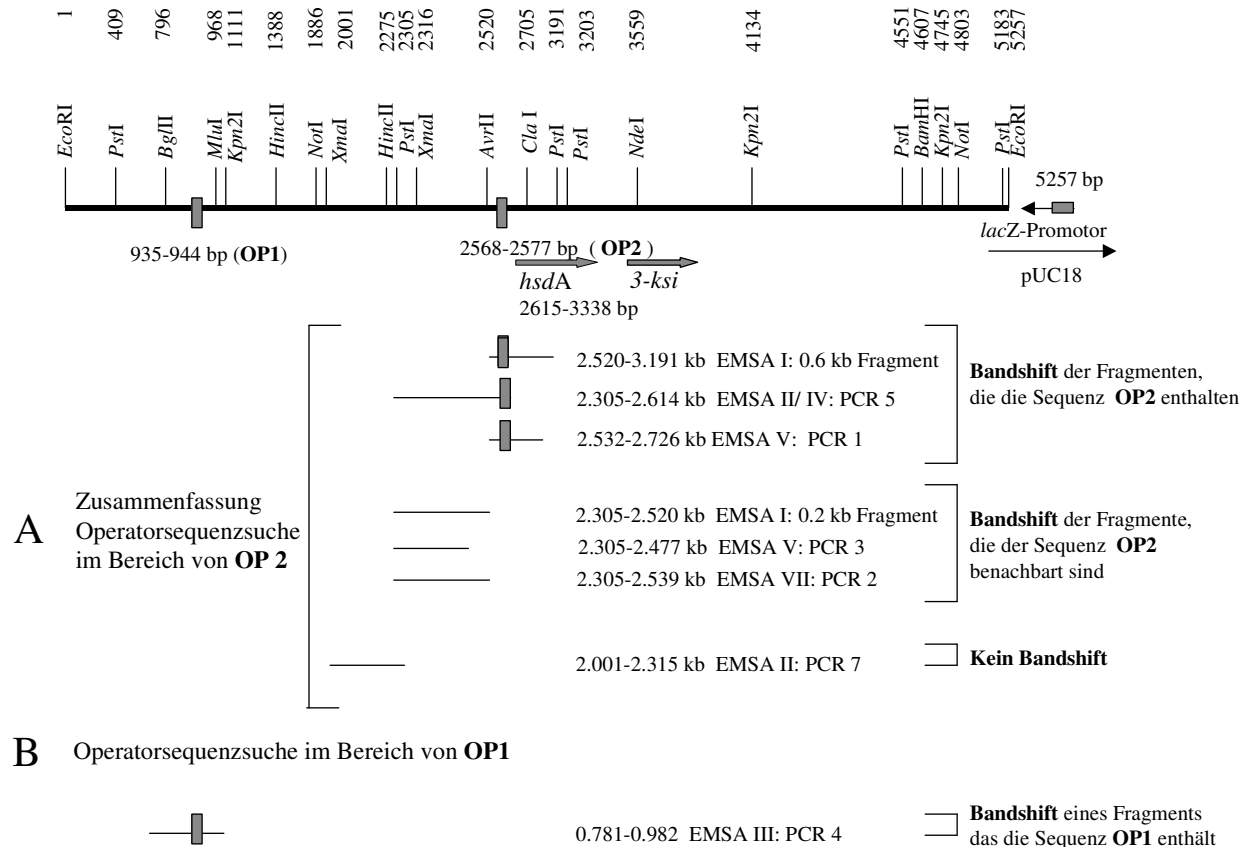


Abb. 30: Überblick über die mittels EMSA erhaltenen Ergebnisse zur Operatorsequenzsuche der 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase
Oben: p6 (5.257 kb), OP1(0.935-0.944 kb) und OP2 (2.568-2.577 kb) fett markiert, *hsdA*.

Unten: schematische Zusammenfassung der Ergebnisse zur Operatorsequenzsuche

A: Zusammenfassung der Ergebnisse der Operatorsequenzsuche im Bereich von OP2.

Die oberen sechs gezeigten PCR-Fragmente haben einen Bandshift gezeigt. Drei enthalten die Sequenz von OP2 (fett markiert), drei liegen stromaufwärts benachbart zu OP2. Das untere der Fragmente unter A) zeigte keinen Bandshift.

B: Ergebnis der Operatorsequenzsuche im Bereich von OP1

Das abgebildete Fragment enthält die Sequenz des OP1 und zeigte im EMSA einen Bandshift.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass an OP1 und OP2 eine spezifische Proteinbindung im Electrophoretic mobility shift assay erfolgt und somit eine

Operatorfunktion vorliegen könnte (z.B. EMSA II, EMSA IV, EMSA V). Des weiteren konnte aber auch eine Proteinbindung an eng benachbarten Genabschnitten gesehen werden (z.B. EMSA V, EMSA VII). Dies wirft die Frage nach der Konformation des Operators bzw. der Operatoren, aber auch des Repressors auf.

In Abbildung 30 sind die auf eine Operatorfunktion überprüften PCR-Fragmente abgebildet und zusammengefasst. Die sechs oberen Fragmente, die zum Teil die Sequenz OP2 enthalten, zeigten im EMSA einen Bandshift (EMSA I, II, IV, V). Drei von ihnen (Abb. 30, 0.6 kb-Fragment, PCR5, PCR1) enthalten die palindromische Sequenz (OP2, 2.568-2.577 kb), drei von ihnen enthalten die palindromische Sequenz nicht und liegen nur benachbart zu ihr. Die Fragmente liegen in einem maximalen Abstand von 0.091 kb zur Sequenz OP2 (Abstände jeweils 0.2 kb-Fragment: 0.048 kb, PCR5: 0.091 kb, PCR1: 0.029 kb). Diese PCR-Fragmente (Abb. 30, 0.2 kb-Fragment, PCR3, PCR2) zeigten ebenfalls einen Bandshift (EMSA I, V, VII). Das Fragment PCR7 (Abb. 30) erstreckt sich von 2.001 kb-2.315 kb und zeigt keinerlei Bindungsaktivität. Es ist vom Beginn der Sequenz OP2 0.253 kb entfernt.

Es besteht die Vermutung, dass der aktiv bindende Operatorbereich sich nicht nur auf die palindromische Sequenz OP2 erstreckt, sondern diese enthält und sich darüber hinaus auf die benachbarten Bezirke ausdehnt. Da die Repressoren ihrerseits auch eine gewisse Größe aufweisen, erscheint es plausibel, dass die Operatorsequenz der 3 α -HSD nicht nur 10 bp umfasst, was der palindromischen Sequenz entspricht. Das PCR-Fragment PCR 4 (Abb. 30/B) zeigte eine deutliche Bindungsaktivität. Es enthält die Sequenz OP1.

Wie an anderer Stelle beschrieben (Kap. 4.2.4, DNA-Looping) lässt sich in vielen Bakterien der Mechanismus der DNA-Loopbildung zur effizienteren Repression finden. Obwohl OP1 und OP2 in diesem Fall 1.633 kb voneinander entfernt liegen, lässt sich auch hier eine Loopbildung vermuten, da die Operatorsequenzen zueinander palindromisch liegen. In anderen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Maser gewonnenen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass Veränderungen der Distanz zwischen OP1 und OP2 eine Veränderung des Bindungsverhalten des Repressors zur

Folge hatten (Xiong et al, 2003). Bei einer starken Verkürzung der Entfernung konnte die Repression der 3 α -HSD nicht aufrechterhalten werden, die Loopstruktur kann nicht ausgebildet werden.

4.1.3 Diskussion zu den Ergebnissen der HPLC

Mittels der HPLC wurde die spezifische Aktivität (Kap.2.7, Kap. 3.5) der 3 α -HSD, die aus verschiedenen Deletionsplasmiden gewonnen wurde, ermittelt. Diese Methode wurde vorher in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Maser beschrieben und zur spezifischen Aktivitätsmessung der 3 α -HSD eingesetzt (Oppermann et Maser, 1996; Möbus et Maser, 1998; Xiong et Maser, 2001). Alternativ kann der Nachweis der quantitativen Proteinexpression ($\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein) der 3 α -HSD mit Hilfe des ELISA geführt werden (Xiong et Maser, 2001; Xiong et al., 2001). Die Messungen gaben Hinweise auf ein jeweiliges Operator- bzw. Repressorverhalten. Es lässt sich im Einzelfall allerdings nicht genau differenzieren, ob eine Aktivitätsveränderung durch das Fehlen einer der Operatorregionen in der jeweiligen Deletionsmutante zustande kommt oder die Zerstörung der Sequenz für einen möglichen Repressor dafür verantwortlich ist.

Wie zuvor schon dargestellt, wurden sechs verschiedene Plasmide zur Aktivitätsmessung generiert (p6, p6B4, p6N11, p6BM17, pAX1) (Ergebnisse, Kap. 3.5, Abb. 27/B), um mit ihrer Hilfe die für ein oder mehrere Repressorproteine codierende Sequenz näher bestimmen zu können. Die Grundaktivität liegt bei 6.101 nmol/mg/min. Grundaktivität deshalb, weil in dem Plasmid p6, das eine Länge von 5.275 bp aufweist und in pUC18 kloniert wurde (Bild: Ergebnisse, Abb. 27A/B), alle regulatorischen Elemente für *hsdA* enthalten sind. Das Fragment enthält 4 offene Leserahmen (Bild: Ergebnisse, Abb. 27A/B). Die niedrigste spezifische Aktivität wird bei dem Plasmid p6N11 beobachtet (0.278 nmol/mg/min). p6N11 umfasst mit einer Länge von 3559 bp orf 1 und orf 4, die beide in der entgegengesetzten Richtung von *hsdA*, deren Sequenz in p6N11 ebenfalls enthalten ist, abgelesen werden (Bild Ergebnisse, Abb. 27B). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die codierende Region für ein Repressorprotein eventuell im Bereich des orf 4 (2065-3328 bp) oder des orf 1(462-2461 bp) liegen

könnte und die gemäß der Sequenz von orf 4 und orf 1 in entgegengesetzter Richtung von *hsdA* abgelesen wird.

In anderen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Maser durchgeführten Experimenten konnte ein Repressor, der von orf 1 codiert wird, ausgeschlossen werden. Es wurden zwei Plasmide generiert, die beide den orf 1 und zum kleinen Teil den orf 4 enthalten (pKEA5, pKEA8). Bei pKEA5 liegt der *lacZ*-Promotor in entgegengesetzter Richtung von *hsdA*, bei pKEA8 in Richtung von *hsdA*. Diese Plasmide wurden einer Aktivitätsmessung mittels ELISA unterzogen, nach Kotransformation mit einem Plasmid (pAX1, s. Ergebnisse, Abb. 27/B), das die 3 α -HSD und orf 2 und orf 3 enthält. Ergebnisse dieser Arbeit ergaben, dass Proteine, die von orf 2 und orf 3 codiert werden im EMSA keine Bindungsaktivität zeigten. In der Deletionsmutante pAX1 kann die 3 α -HSD in voller Stärke exprimiert werden. Ebenso konnte in der oben beschriebenen Aktivitätsmessung nach Kotransformation keine Repressoraktivität ausgemacht werden (Xiong et al, noch nicht publizierte Ergebnisse). Das lässt darauf schließen, dass der orf 1 nicht für ein Repressorprotein codiert.

Auch das Plasmid p6B4 (Bild: Ergebnisse, Abb. 27B) zeigt eine verminderte spezifische Aktivität von 3.601 nmol/mg/min. Das Plasmid weist eine Länge von 4.607 kb auf, es fehlt in dieser Deletionsmutante orf 3 (4.606-5.017 kb), der *lacZ*-Promotor ist hier in Richtung orf 4 verschoben, so dass dieser stärker abgelesen werden könnte und die Expression der 3 α -HSD stärker supprimiert würde. Es wurden aber auch Untersuchungen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Maser durchgeführt, die einen zweiten Repressor nachwiesen, der auf mRNA-Ebene seine repressorische Aktivität entfaltet (Xiong et al., 2003). Dieser ist im Bereich von orf 2 (4.084-4.320 kb) lokalisiert (Xiong et al, 2001). So kann im Fall von p6B4 die verminderte Aktivität auch durch die Repression durch beide Repressoren verursacht sein.

p6KP4 zeigt eine ähnliche spezifische Aktivität wie p6 von 5.981 nmol/mg/min. Es umfasst die Sequenz von 1.111 kb-4.134 kb, es fehlen Teile von orf 1 sowie orf 3 und der größte Teil des orf 2. Entsprechend dem Hinweis, dass Teile des orf 4 eventuell für ein Repressorprotein codieren, müsste man eine sehr viel niedrigere Aktivität erwarten.

orf 1 enthält aber zudem noch die eine der zwei gefundenen palindromischen Sequenzen (Ergebnisse, Abb. 27A, 0.935-0.944 kb) mit der Länge von 10 Nukleotiden, von der eine Operatoraktivität zusammen mit der zweiten palindromischen Sequenz (Ergebnisse, Abb. 27A, 2.568-2.577 kb) im Sinne einer Loopbildung vermutet wird. Fällt der vermutete OP1 nun in p6KP4 weg, ist die Aktivität höher als in p6N11 oder p6B4.

So wurde mit p6BM17 isoliert diese kurze Gensequenz des vermuteten OP1 überprüft. In p6BM17 fehlt im Vergleich zu p6 nur eine kurze Region von 0.796-0.986 kb, in der die Sequenz von OP1 enthalten ist (Abbildung 27A/B). Die spezifische Aktivität steigt erwartungsgemäß (8.284 nmol/mg/min).

Die höchste Aktivität wird bei der Deletionsmutante pAX10 (Abb. 27A/B, Ergebnisse) gefunden. Bei einer Länge von 2.737 kb fehlen orf 1 und große Teile des orf 4. orf 3 und orf 2 sind vollständig enthalten. Dazu fehlt die weiter stromaufwärts gelegene palindromische Sequenz (Abb. 27A, 0.935-0.944 kb). Diese Ergebnisse stützen den Verdacht, dass orf 4 eventuell die Sequenz für den Repressor codiert, sowie den Verdacht, dass die beschriebene palindromische Sequenz Operatoraktivität hat. Außerdem bestätigt dieses Ergebnis, dass der gefundene Repressor B (Xiong et al., 2003) anscheinend nicht an DNA-Sequenzen, zumindest aber nicht an OP2 (Abb. 27/A) binden kann, da Repressor B in der Mutante pAX1 enthalten ist und die spezifische Aktivität derartig hoch ist.

4.1.4 Diskussion zu den möglichen Repressoren der 3 α -Hydroxysteroid-dehydrogenase

Die vorliegende Arbeit hatte ebenfalls zum Ziel, mögliche Gensequenzen auf dem oben beschriebenen Genabschnitt von *C. testosteroni* zu verifizieren, die für ein Repressorprotein bzw. mehrere Repressorproteine codieren. Dabei wurden die verschiedenen offenen Leserahmen (orf 1-4, Abb. 8), die im Bereich von *hsdA* liegen näher untersucht. Zuerst wurde eine Bindungsaktivität (EMSA I, EMSA II, EMSA III, EMSA VIII) bei den Proteinen festgestellt, die vom Plasmid p6 stammen (enthält orf 1-

4) festgestellt und die alle vier offenen Leserahmen enthalten (Abb. 31). Danach wurden die in Abbildung 31 gezeigten Plasmide kloniert, die einzelne offene Leserahmen enthielten (Abb. 31, p6N4, p6NP1) oder Teile von einzelnen Leserahmen (Abb. 31, pKCN2, pK17). Es wurden mittels EMSA die offenen Leserahmen orf 2, orf 3 und orf 4 (Abb. 31) auf eine mögliche Bindungsaktivität an DNA-Sequenzen von *C. testosteroni* überprüft.

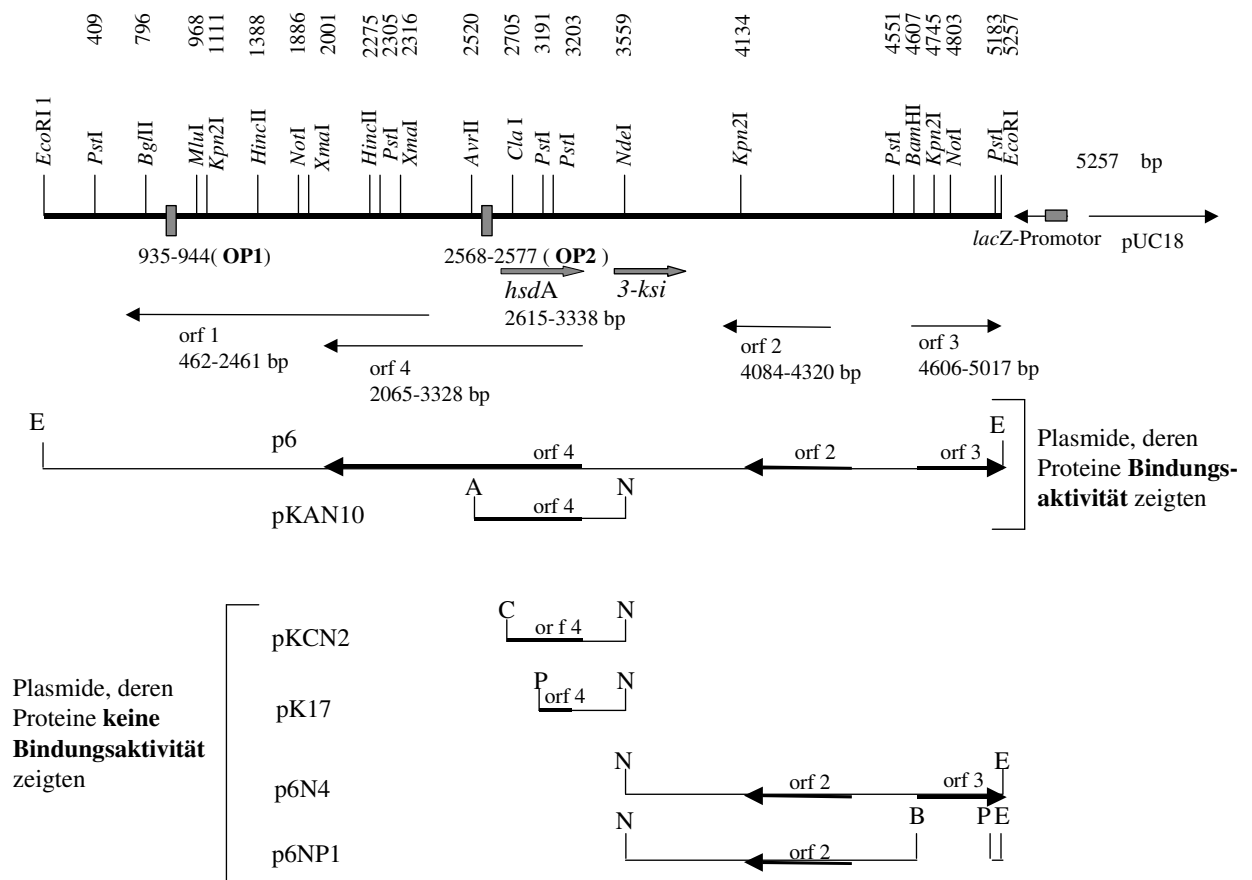


Abb. 31: Überblick der mittels EMSA erhaltenen Ergebnisse zur Repressorproteinsuche der 3α-HSD

Oben: p6 (5.257 kb), OP1 (0.935-0.944 kb) und OP2 (2.568-2.577 kb) fett markiert, *hsdA*. orf 1 (0.462-2.461 kb); orf 4 (2.065-3.328 kb), orf 2 (4.084-4.320 kb) und orf 3 (4.606-5.017 kb)

Unten: Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse zur Repressorproteinsuche. In den dargestellten Plasmiden sind die enthaltenen Sequenzen der verschiedenen offenen Leserahmen fett gezeigt. Die zwei oberen Plasmide (p6, pKAN10) zeigten im EMSA einen Bandshift, die vier unteren Plasmide (pKCN2, pK17, p6N4, p6NP1) zeigten im EMSA keinerlei Bindungsaktivität.

Im EMSA VIII wird gezeigt, dass orf 2 und orf 3 (Plasmid: p6N4, Abb. 31) keine Bindungsaktivität haben, im EMSA IX wird ebenfalls keine Bindungsaktivität für orf 2 (Plasmid: p6NP1, Abb. 31) gesehen. Mit dem Plasmid pKAN10 wurde der orf 4 überprüft (Plasmid: pKAN10, Abb. 31). Im EMSA IV und V wurde eine Bindung an DNA-Sequenzen gesehen. Das Plasmid pKAN10 enthält große Teile des orf 4. Es besteht eine Überschneidung von 2.520 kb (*AvrII*-Schnittstelle) - 3.328 kb (Beginn von orf 4). Das entspricht 0.808 kb (Abb. 31). Weiterhin wurden kürzere Sequenzen des orf 4 auf Bindungsaktivität überprüft. Im EMSA VII ist zu sehen, dass mit Protein des Plasmids pKCN2 (Abb. 31) kein Bandshift erreicht wurde. pKCN2 überlappt, wie auch pKAN10, mit dem Beginn von orf 4 im Bereich von 2.705 kb (*ClaI*-Schnittstelle) – 3.328 kb (Beginn von orf 4). Eine Überschneidung besteht, kürzer als bei pKAN10, in einem Bereich von 0.623 kb. Ebenfalls kein Bandshift wurde mit Protein des Plasmids pK17 erreicht, es überlappt in einem Bereich von 3.191 kb (*PstI*-Schnittstelle)–3.328 kb (Beginn von orf 4) mit orf 4, das entspricht nur 0.137 kb. Es konnte im EMSA VI kein Bandshift gesehen werden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass in erster Linie ein Protein, das im Bereich von orf 4 (2.065-3.328 kb) liegt, als Repressorprotein fungieren könnte. Die Sequenz umfasst eine Länge von 1.263 kb, welche 420 Aminosäuren codiert. Das entspräche einem Molekulargewicht von 45.4 kDa. Weder Proteine, die von orf 2 noch von orf 3 codiert werden, zeigten im EMSA eine Bindungsfähigkeit an die verwendete DNA von *C. testosteroni*. Die retardierte DNA erschien im EMSA IV und EMSA VIII als Doppelbande, was die Frage nach der Konformation des Repressors aufwirft. Wie bei allen bakteriellen Modellen besteht die Möglichkeit einer Dimer- oder Tetramerbildung des Repressors (Müller-Hill, 1998). Hierauf wird in den Kapiteln 4.2.2, 4.2.3, 4.2.4 und 4.2.5 noch eingegangen.

4.2 Genregulation in Bakterien

4.2.1 allgemeine Regulation

Bakterien können flexibel auf Veränderungen in Umweltbedingungen und Nahrungsangebot reagieren. Es werden aus energetischen Gründen nicht alle Enzyme aller Stoffwechselwege konstant exprimiert. Die Zelle hat die Möglichkeit Stoffwechselwege in Abhängigkeit von einem vorhandenen Substrat ein- oder auszuschalten.

In Bakterien und auch in einigen einzelligen Eukaryonten hängt die Synthese spezifischer Enzyme von dem Auftreten ihrer Substrate im Medium ab. Dieser Mechanismus wird Induktion genannt und kann in kürzester Zeit in der jeweiligen Zelle ablaufen. Dieser Typ der Regulation ist in Bakterien weit verbreitet. Das *lac*-Operon in *Escherichia coli* ist ein Paradebeispiel für diese Art von Kontrollmechanismus. Dieses grundlegende Konzept für die Kontrolle der Transkription in Prokaryonten wurde von Jacob und Monod (1961) postuliert.

Gene in Bakterien unterliegen häufig einer sogenannten negativen Kontrolle, d.h., dass ein Repressorprotein die Expression eines Gens durch Bindung an einen Operator verhindert. RNA-Polymerase und ein Repressorprotein konkurrieren um ihre spezifische DNA-Bindungsstelle, die Operatorsequenz (Gilbert et al., 1975). Durch eine suffiziente Repression wird verhindert, dass die RNA-Polymerase den richtigen Promotor findet. Ebenso sind bakterielle Gene ökonomischerweise häufig in Clustern organisiert, wie beim *lac*-Operon. Hier besteht ein Cluster von drei Genen (*lacZYA*), die der Verstoffwechselung von Laktose in *Escherichia coli* dienen. Die Transkription dieser drei Gene wird durch ein Repressorprotein bestimmt, das vom Gen *lacI* exprimiert wird. Dieses Gen hat eine unabhängige Transkription mit eigenen regulatorischen Sequenzen. Es handelt sich um einen klassischen *trans*-agierenden Regulator. Das Repressorprotein (LacR) kann sich zu einem Tetramer zusammenlagern und besteht dann aus vier identischen Untereinheiten à 38 kDa. Modellhaft erklärt, bindet es an eine *cis*-agierende Sequenz, den Operator (*O_{lac}*), der zwischen dem

Promotor (P_{lac}) und den Strukturgenen ($lacZYA$) liegt. In diesem Fall überlappt die Operatorregion mit der des Promotors. Er erstreckt sich von -5 stromaufwärts bis $+21$ bis in die Transkriptionseinheit hinein (Miller et Reznikoff, 1978).

Es sind bereits mehr als 100 Promotoren in *E.coli* sequenziert und charakterisiert worden (Blattner et al., 1997; Nair et Kulkarni, 1994). Einige kurze Sequenzen sind stark konserviert, da sie wichtige Funktionen übernehmen. Es existieren in einem bakteriellen Promotor vier hochkonservierte DNA-Abschnitte: der Startpunkt, die -10 -Sequenz, die -35 -Sequenz und die Distanz zwischen beiden. Der Startpunkt der Transkription ist gewöhnlich ein Nukleotid, meist Purin ($> 90 \%$), dessen Lage in der Sequenz mit $+1$ angegeben wird. Man findet hier oft eine DNA-Sequenz von drei Basenpaaren (CAT). Etwa 10 Basenpaare stromaufwärts, also entgegen der Leserichtung der Polymerase, liegt häufig eine Sequenz mit der für Bakterien typischen Nukleotidfolge $5'$ -TATAAT- $3'$, die -10 Region. In der -35 -Region liegt häufig eine weitere Sequenz, die $5'$ -TTGACA- $3'$, bei der es sich um ein weiteres hochkonserviertes Hexamer handelt. Die Distanz zwischen beiden Sequenzen beträgt bei $> 90 \%$ der bakteriellen Promotoren 16 bp-18 bp (Miller et Reznikoff, 1978).

Als Beispiel für den oben beschriebenen Mechanismus der Induktion konnte gesehen werden, dass bei Zugabe von β -Galactosiden zu *Escherichia coli*, β -Galactosidase innerhalb weniger Minuten in hoher Menge exprimiert wird. Alternativ zur negativen Kontrolle wird auch der Modus der positiven Kontrolle in Prokaryonten beobachtet, bei dem ein Transkriptionsfaktor der RNA-Polymerase die Bindung an die jeweilige Operatorsequenz erleichtert.

4.2.2 Bakterielle Repressoren

Inzwischen hat man mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse die dreidimensionale Struktur mehrerer bakterieller Repressoren aufgeklärt, sowie deren spezifische Bindung an die Operator-DNA. (Slijper et al., 1996; Lewis et al., 1996). Die meisten dieser Proteine sind Homodimere, und jedes ihrer Monomere bildet mit den Basen in einer Hälfte der Operator-DNA ähnliche Kontakte. Geht man davon aus, dass die meisten dimeren

Repressoren symmetrisch sind, so kommt es nicht unerwartet, dass die meisten Operatoren kurze, umgekehrte Sequenzwiederholungen (inverted repeats) darstellen (Galan, 2003). Man kann sich den Operator also als zwei Halbelemente vorstellen, von denen jedes ein Monomer des dimeren Repressorproteins bindet. Bei vielen dimeren Repressoren ragt eine α -Helix in die große Furche der DNA-Helix. Diese α -Helix bezeichnet man als Erkennungshelix (sequence-reading-helix), da die meisten Aminosäureseitenketten, die mit der DNA in Kontakt treten, von dieser Helix stammen. Im allgemeinen bildet ein einziges Repressormolekül zu wenige Wechselwirkungen aus, um sich stabil mit der DNA zu verbinden. Ein Repressordimer bildet jedoch doppelt so viele Wechselwirkungen wie das Monomer, so dass sich ein Repressor auf diese Weise mit hoher Affinität an die Operatorsequenz binden kann. Die Erkennungshelix, die aus der Oberfläche des bakteriellen Repressors herausragt und durch das Eindringen in die große Furche der DNA die DNA-Sequenz erkennt, wird normalerweise in der Proteinstruktur teilweise durch hydrophobe Wechselwirkungen mit einer zweiten α -Helix stabilisiert. Dieses in sich rückläufige Strukturelement, das sich bei zahlreichen bakteriellen Repressoren findet, bezeichnet man als „helix-turn-helix-motif“ (Kimsey, H. H., 2003).

Es wurden aber auch Repressoren gefunden, die aus vier Monomeren bestehen, also einem Tetramer. So ist beispielsweise der Arc-Repressor des Bakteriophagen P22 ein Tetramer, das mit den Basen des Operatorhalbelements und der großen DNA-Furche über die Seitenketten zweier antiparalleler β -Stränge in Wechselwirkung tritt (Raumann et al., 1994). Die regulatorischen Proteine der LacI-GaIR-Familie (Müller-Hill, 1983, Weikert et Adhya, 1992) liegen häufig als Dimere vor. In *E. coli* können die Repressoren LacR, FruR und RafR ebenso Tetramere ausbilden

Wie unter 4.2.1 beschrieben ist das *lac*-Operon in *E. coli*, das 1961 von Jacob und Monod postuliert wurde (Jacob et Monod, 1961), eines der am besten untersuchten regulatorischen Systeme in Prokaryonten. Das Operon besteht neben seinen regulierenden Elementen aus Gensequenzen für drei spezifische Enzyme, die in der Zelle synthetisiert werden und die im Laktosestoffwechsel des Bakteriums unerlässlich sind. Ihre Synthese unterliegt einer negativen Kontrolle durch das Substrat selbst. In

einigen Prokaryonten, wie auch in den meisten Eukaryonten, unterliegen die meisten Systeme einer positiven Kontrolle durch einen Aktivator. Dabei wurde für einige Transkriptionssysteme herausgefunden, dass einige Repressoren ebenfalls als Aktivatoren fungieren können, sowie umgekehrt Aktivatoren als Repressoren (Ptashne, 1992).

1966 isolierten Müller-Hill und Gilbert den lac-Repressor des *lac*-Operons in *E. coli* unter Ausnutzung seiner Eigenschaft ¹⁴C-markiertes IPTG zu binden und zeigten damit, dass es sich bei dem Repressor um ein Protein handelt (Gilbert, 1966). Der *lac*-Repressor konkurriert dabei mit der RNA-Polymerase um die Bindungsstelle am *lac*-Operator (Gilbert et Müller-Hill, 1975). Der lac-Repressor ist ein Homotetramer, der in Abwesenheit des Induktors unspezifisch an die Duplex-DNA binden kann, jedoch mit ungleich höherer Affinität an die spezifischen lac-Operatorsequenzen. Der lac-Repressor scheint nach unspezifischer Bindung an die DNA und anschließendem Entlanggleiten am DNA-Strang die effizienteren Operatorsequenzen zu finden. Er besteht aus vier Domänen: dem aminoterminalen Kopfstück, welches für die Operatorbindung verantwortlich ist, einem Scharnierstück, welches das Kopfstück mit dem Kernstück verbindet, dem Kernstück, welches für die Bindung des Induktors und die Dimerbildung zuständig ist und der carboxyterminalen Helix, die für die Tetramerbildung verantwortlich ist. Die Struktur des Kernstücks und des carboxyterminalen Endstücks wurde 1995 entdeckt (Friedman, 1995).

4.2.3 Bakterielle Operatoren in Interaktion mit ihren Repressoren

Es werden in der bakteriellen Genregulation häufig mehr als eine Operatorsequenz gefunden (Kimsey et Waldor, 2003; Galan et al., 2003; Lewis et al., 1996). Im Galaktose-verstoffwechselnden *lac*-Operon in *E. coli* findet man drei Operatorregionen: O1 als Hauptoperatorsequenz, O2 und O3 als zusätzliche Operatoren, insgesamt im Abstand von ca. 500 bp (Müller-Hill, 1998; Lewis et al., 1996). Der Repressor-Operorkomplex kann mit Hilfe mehrerer Operatoren stabiler ausgebildet werden. Dabei binden zwei Untereinheiten des Repressortetramers an O1, O2 oder O3, die zwei übrigen Untereinheiten können dann an einen der zwei anderen Operatoren, unter

Ausbildung eines DNA-Loops, binden. Die zusätzlichen Operatoren sind also besonders bei niedrigen Konzentrationen des Repressorproteins und bei räumlicher Nähe zum Hauptoperator im Falle des *lac*-Operons wirksam (Müller-Hill, 1998). In der Kristallographie konnte gesehen werden, dass ein Repressor-Tetramer synergistisch mit einem Hilfsprotein (CAP, catabolite gene activator protein) wirkt (Lewis et al., 1996).

Als weiteres Beispiel dient der Trp-Repressor des Tryptophan-Operons in *E. coli*. Hier können an starke Operatoren bis zu drei dimerische Repressorproteine binden, die dann ein Hexamer ausbilden. Die Operatoren liegen in einer Entfernung von 8 bp (Yang et al., 1996; Günes, 1996; Bareket-Samish et al., 1997). Ebenso im *gal*-Operon wurden zwei Operatoren nachgewiesen, die im Abstand von 118 bp zueinander liegen. Das *hpa*-meta-Operon in *E. coli* lässt sich durch verschiedene Phenollessigsäuren induzieren. Es konnten zwei Operatoren identifiziert werden (OPR1 bzw. OPR2), die zwischen dem *hpa*-meta-Operon und dem Repressorgen (HpaR) liegen. OPR1 enthält eine pallindromische Sequenz, die mit dem Transkriptionsstart (+1) vom Pg-Promotor überlappt, die Sequenz von OPR2 ist ähnlich, aber nicht perfekt pallindromisch. Sie liegt weit stromabwärts. Bei der Bindung des Repressors (HpaR) an OPR2 besteht eine Kooperation mit OPR1. In „footprint“-Analysen konnte eine Repression für HpaR gesehen werden. In Vergleichsanalysen mit anderen homologen Regulatoren (MarR, MexR) kann angenommen werden, dass es sich bei HpaR um ein Dimer handelt (Galan et al., 2003).

CTXphi ist ein filamentöser Phage, der für das Cholera toxin codiert und sein Genom in das von *Vibrio cholerae* integriert, um dort stabile Lysogene zu formen. In diesen Lysogenen wird die Genexpression, die vom *rstA*-Phagenpromotor ausgeht, durch den Phagencodierten Repressor RstR reprimiert. Das Repressorprotein RstR, das aus dem Bakteriophagen CTXphi gereinigt wurde, bindet an drei 50 bp voneinander entfernte Operatoren in der Promotorregion. In „Footprint“-Analysen konnte gesehen werden, dass der Repressor die DNA in Form zweier Dimere (Dimer-of-Dimer) bindet (Kimsey et Waldor, 2003). Mittels Cross-linking-Experimenten konnte eine Tetramerbildung von RstR beobachtet werden. Bei Mischung von Wildtyp RstR und einem mutierten, in der Länge veränderten RstR banden diese, sichtbar im Electrophoretic Mobility Shift Assay, als Repressor-Tetramer. Es wird angenommen, dass je zwei Repressordimere im

Zusammenschluss an einen Operator binden und durch das so gebildete Tetramer mehr Stabilität gewonnen werden kann (Kimsey et Waldor, 2003).

4.2.4 DNA-Looping

Verschiedene Arten von DNA-Multiprotein-Komplexen sind an verschiedenen DNA-Transaktionen wie Transkription, Replikation und Reparatur beteiligt (Echols, 1990).

Die Loopbildung von DNA wurde als ein Mechanismus der Genregulation, DNA-Replikation und Rekombination von Prokaryonten und Eukaryonten beschrieben. Ebenso wurde sie als eine Funktion in anderen Protein-DNA-Transaktionen wie Reparatur oder chromosomale Segregation beobachtet (Schleif, R. 1992).

Während das Grundprinzip der Loopbildung in allen Systemen gleich ist, gibt es in den präzisen biochemischen Details und der Anwendung des Mechanismus verschiedener Organismen große Unterschiede. Ökonomischerweise kann durch eine Loopbildung auch bei niedrigen Proteinkonzentrationen eine Wirkung auf mehrere Zielsequenzen der DNA erzielt werden, wenn diese trotz eines eigentlich großen Abstandes zusammentreten können. Es sind nicht zwingend festgelegte Abstände zwischen zwei Zielsequenzen erforderlich, so dass die Genregulation auf Transkriptionsebene flexibler ablaufen kann (Schleif, R., 1992).

Am *lac*-Operon in *E. coli* kann gezeigt werden, dass durch eine Genregulation, die auf Loopbildung der DNA basiert, Fluktuationen im Transkriptionsvorgang reduziert werden können und die Sensitivität auf eine ständig wechselnde Anzahl von regulatorisch wirkenden Proteinen gesenkt werden kann. Insgesamt kann z.B. hierdurch das Niveau der Repression angehoben werden (José et Leibler, 2003).

Eine DNA-Loopbildung wird auch am *gal*-Operon in *E.coli* beobachtet. Das Operon besitzt die Promotoren P1 und P2. Interessanterweise wird P1 suffizient durch die Bindung des Repressorproteins (GalR) an einen der zwei Operatoren (O_E) reprimiert,

um P2 zu supprimieren ist die Ausbildung eines DNA-Loops notwendig. Hier bindet ein GalR-Dimer an die zwei Operatoren (O_E , O_I), welche die Promotorregion umfassen (Irani et al., 1983) und bilden den Loop (113 bp) im Wildtypbakterium mithilfe eines „histone-like-Protein“ (HU) aus (Lewis, 1999). Es wurde jedoch auch eine spontane Loopbildung nach Zugabe einer durch eine Aminosäure substituierten Repressormutante beobachtet. Die Affinität zwischen den mutierten GalR-Repressoren, als Dimer zusammenzutreten, ist erhöht. Ein GalR-Dimer ist in der Lage, den DNA-Loop zu schließen, HU begünstigt eine GalR-Tetramerbildung. Es konnte aber mittels Cross-linking-Experimenten ebenso eine spontane Trimer- oder Tetramerbildung beobachtet werden. Bei der Deletion einer der Operatoren blieb das Zusammentreten des Loops aus, was sich in einer fehlenden Repression manifestierte (Semsey et al., 2002).

4.2.5 Formen der DNA-Loopausbildung

DNA-Multiprotein-Komplexe enthalten oftmals topologisch unabhängige DNA-Domänen. Durch an spezifische DNA-Sequenzen bindende Proteine können DNA-Loops gebildet werden, die diese Domänen zusammenbringen. Dieser Vorgang kann unterschiedlich ablaufen (Abb. 32, 1-5).

- 1) Zwei gleiche oder ungleiche Proteine binden an verwandte DNA-Sequenzen und interagieren direkt miteinander (Irani et al., 1983; Dunn et al., 1984; Su et al., 1990; de Beer et al., 2002)
- 2) Ein zweiseitiges Protein bindet simultan an zwei DNA-Domänen (Kramer et al., 1987; Nash, 1996)
- 3) Wie unter 1) schließen zwei DNA-gebundene Proteine den Loop, interagieren aber nicht direkt miteinander, sondern mithilfe eines Adapters (Kallipolitis et al., 1997)
- 4) Die Loopbildung der DNA kann durch ein anderes DNA-bindendes Protein unterstützt werden, das sich z.B. an einer architektonisch kritischen Stelle der DNA befindet (Santero et al., 1992; Aki et al., 1996; Nash, 1996; Wasseem et al. 2000; Thomas et Tarvers, 2001; de Beer et al., 2002)

5) der unter 3) beschriebene Adapter hat gleichzeitig eine Funktion als Architekturprotein wie unter 4) und unterstützt so zweifach die Loopausbildung (Cosma et al, 2001; Kar et Adhya, 2001)

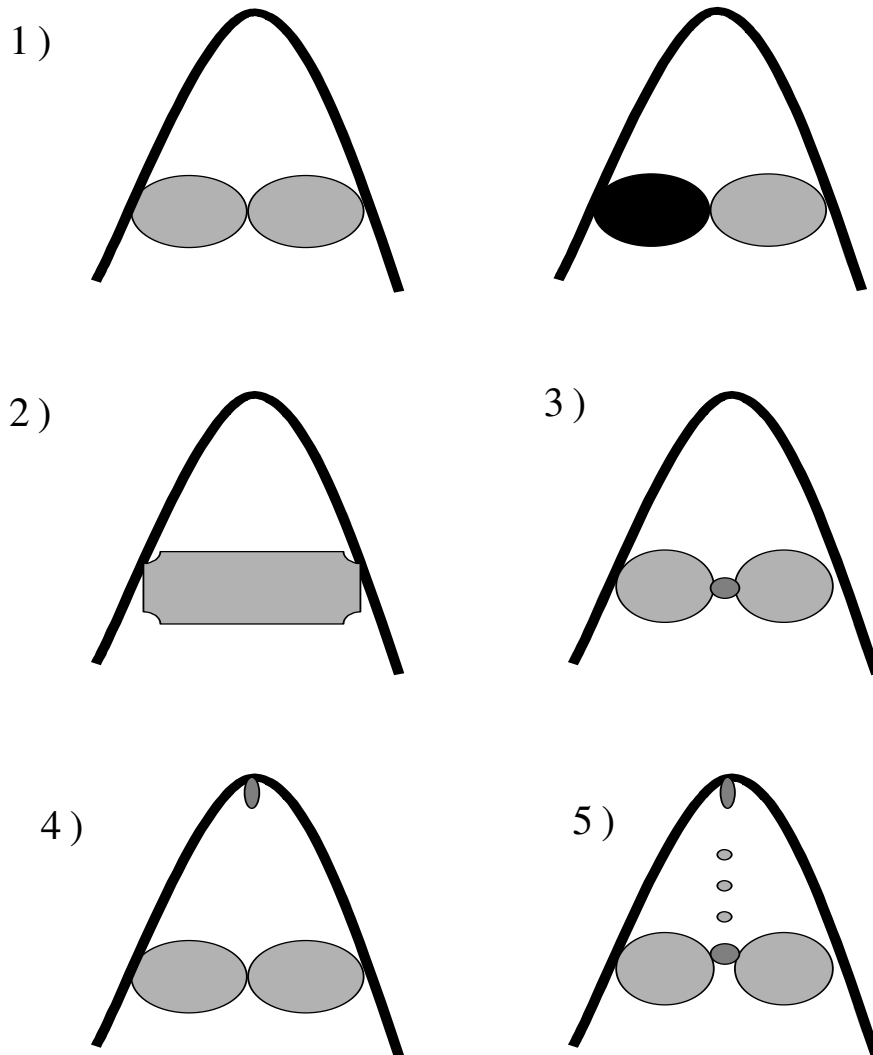


Abb. 32: Formen der Loopausbildung, Erläuterungen im Text, verändert nach Semsey et al., 2002

In dieser Arbeit wurde ein an die DNA bindendes Repressorprotein identifiziert (Repressor A). In einigen der durchgeführten Bandshift Assays wurde die retardierte DNA als Doppelbande gesehen. Eine Möglichkeit wäre das Zusammentreten von mehreren Repressorproteinen im Sinne einer Tetramerbildung. Ein mögliches Modell zeigt Abb. 33.

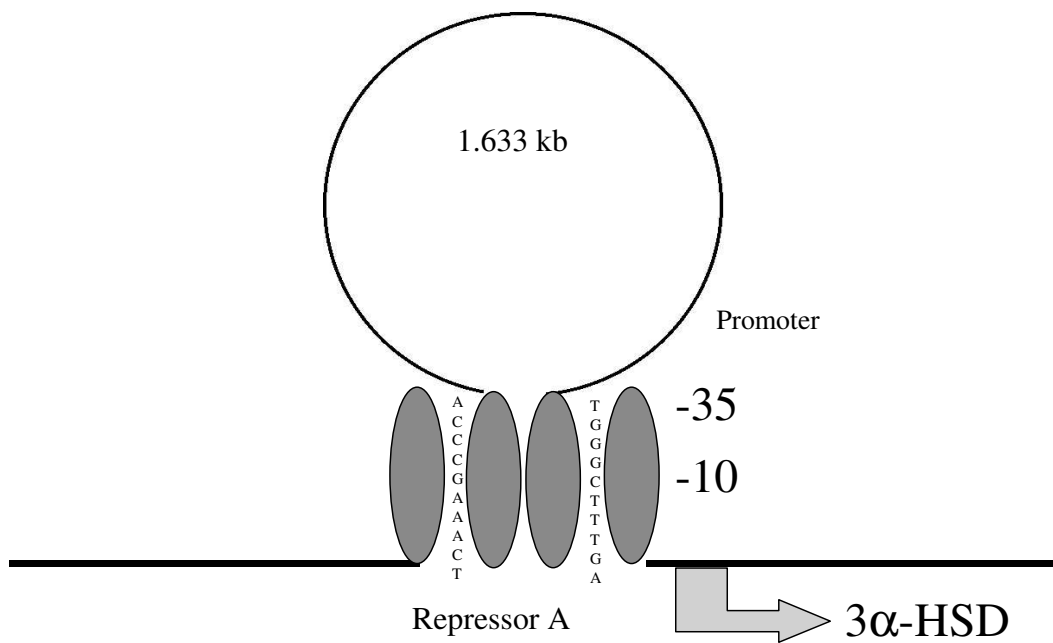


Abb. 33: Modell der Regulation der 3α-HSD durch Repressor A mit möglicher Tetramerbildung

4.3 Einsatzmöglichkeiten von *Comamonas testosteroni* in Medizin und Umwelttechnik

4.3.1 Umwelttechnik

Comamonas testosteroni kann als steroidabbauendes Bakterium in vielfältiger Weise im umwelttechnischen Bereich an Bedeutung gewinnen, z.B. bei der Aufreinigung von mit langlebigen Steroidverbindungen kontaminierten Böden und Gewässern. Dies wird heutzutage als Bioaugmentation bezeichnet und meint damit die zügige Entfernung unerwünschter Verbindungen aus kontaminierten Medien durch die Verwendung bakterieller Wildtypen oder genetisch veränderter Mikroorganismen (Van Limbergen et al., 1998). Steroidale Verbindungen können stark in ökologische Systeme eingreifen. Die Effekte betreffen insbesondere aquatische Systeme. So wurden beispielsweise Verweiblichungsphänomene wie die Induktion der Synthese von Vitellogenin in männlichen Fischen, u. a. verursacht durch natürliche und synthetische Steroide und Alkylphenole (Purdom et al., 1994; Harries et al., 1997), und die Vermännlichung weiblicher Vorderkiemenschnecken durch Organozinnverbindungen (Oehlmann et al., 1996) beobachtet. Bei verschiedenen Fischarten wurden auch Entwicklungsstörungen der Geschlechtsorgane wie Hemmungen des Hodenwachstums und Intersex beobachtet (Jobling et al., 1998; Gercken et Sordyl, 2001). Ein weiteres Beispiel ist die starke Abnahme der Alligatorenpopulation im Apopka-See in Florida, wo Veränderungen an den Reproduktionsorganen der Tiere wegen hoher Belastungen mit DDT auftraten (Guillette et al., 1994). Eine eindeutige kausale Beziehung zwischen einer einzelnen Substanz und der beobachteten Wirkung ist allerdings nicht immer möglich, da in Umweltmedien im allgemeinen eine Vielzahl endokrin wirksamer Substanzen gleichzeitig vorkommt und über additive, synergistische und antagonistische Effekte nur wenig bekannt ist. Obwohl die endokrine Wirkung z. B. von Bisphenol A bereits seit 1936 bekannt ist (Dodds et Lawson, 1936), gab erst die Postulierung der sogenannten Estrogen-Hypothese (Sharpe et Shakkebaek, 1993) Anfang der 90er Jahre den Anstoß zu umfangreicheren Untersuchungen. In dieser Hypothese wird die Frage nach einem kausalen Zusammenhang zwischen der Exposition gegenüber estrogen wirksamen (Schad-) Stoffen und langfristig festgestellten Störungen des

Reproduktionssysteme bei der Bevölkerung der Industriestaaten aufgeworfen (z.B. sinkende Spermienzahl und -qualität, Zunahme von Mammakarzinomen). Der direkte Zusammenhang von Ursache und negativer endokriner Wirkung konnte beim Menschen bisher nur für das synthetische Estrogen Diethylstilbestrol (DES) nachgewiesen werden (Hogan et al., 1987). Die Substanz wurde von 1947 an bis in die 80er Jahre schwangeren Frauen zur Vermeidung von Fehlgeburten verabreicht. Die Folgen waren das vermehrte Auftreten von Krebserkrankungen bei den Frauen und ihren Töchtern sowie krankhafte Veränderungen der Geschlechtsorgane sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Nachkommen. Da endokrine Wirkungen nicht nur estrogen, sondern auch antiestrogen, androgen und antiandrogen sein können, sollte heute eher von einer „Endokrinen-Hypothese“ gesprochen werden (Skakkebaek, 2001).

4.3.2 Medizin

C. testosteroni kann steroidale Verbindungen als einzige Kohlenstoffquelle nutzen und diese komplett abbauen. Diese Eigenschaft lässt den Mikroorganismus auch für medizinische Einsätze interessant werden.

Die in westlichen Ländern höchste Sterblichkeit wird an erster Stelle durch Erkrankungen der Blutgefäße und des Herz-Kreislaufsystems verursacht. Diese Erkrankungen sind zum Teil auf Risikofaktoren wie Nikotinabusus, Mangel an Bewegung, Adipositas und Diabetes mellitus zurückzuführen. Ein großer Risikofaktor stellen aber auch die Lipidstoffwechselstörungen dar, die zum Teil durch eine erhöhte Fettzufuhr bei falscher Ernährung zustande kommen. Es gibt auch verschiedenste Formen der vererbten Lipidstoffwechselstörungen, unter denen die familiäre Hypercholesterinämie (Typ IIa nach Fredrickson) eine häufige darstellt. Als Folgeerkrankung lässt sich besonders die Arteriosklerose finden mit ihren Komplikationen der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit, der arteriellen Verschlusskrankheit mit möglichem Schlaganfall und der koronaren Herzkrankheit mit möglichem Herzinfarkt. Die bisherige medikamentöse Therapie durch Clofibrinsäurederivate oder Cholesterinsyntheseenzymhemmer sind zum Teil mit starken Nebenwirkungen verbunden oder sind bei vorliegenden Kontraindikationen nicht einsetzbar. Hier

bestehen die Möglichkeiten eines Organismus wie *Comamonas testosteroni*, der z.B. Cholesterin verstoffwechseln kann. Eine signifikante Senkung des Cholesterinspiegels kann die möglichen medizinischen Risiken einer Lipidstoffwechselstörung minimieren. Es konnte bereits für bestimmte Mikroorganismen ein Einfluss auf die Stoffwechselvorgänge, im besonderen der gastrointestinale Abbau von steroidal Verbindungen in Eukaryonten, nachgewiesen werden. So zeigte sich am Beispiel von Schweinen eine signifikante Senkung der Gesamtcholesterinspiegel und eine Senkung des LDL-Cholesterol durch die Gallensalzhydrolase (BSH) von *Lactobacillus reuteri* (De Smet et al., 1988). Gleiches konnte für *Lactobacillus casei* nachgewiesen werden (Bomba et al., 1998).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die molekularbiologischen Grundlagen des Steroidmetabolismus gelten auf dem Gebiet der eukaryontischen Organismen als ein bereits gut erforschtes Gebiet. Im Bereich der Prokaryonten konnten bisher wenig Erkenntnisse gewonnen werden. Das gram-negative Bakterium *Comamonas testosteroni* ist ein steroidmetabolisierender Organismus, der seine steroidabbauenden Enzyme und auch seine im Steroidmetabolismus eingesetzten Transport- und Bindeproteine nicht konstitutiv exprimiert, sondern einer Induktion durch die Substrate selbst unterliegt. Die Mechanismen dieser Steroidinduktion sind bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Es wurden bisher eine Reihe von Enzymen identifiziert, die am vollständigen Abbau der Steroide bis zur Bildung von H₂O und CO₂ beteiligt sind. Ein Schlüsselenzym ist die 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase/Carbonylreduktase, die die Aromatisierung des A-Rings durch Oxidation katalysiert und dadurch die Spaltung des B-Ringes und den weiteren Abbau ermöglicht.

Ziel dieser Arbeit war es, die Regulation der 3 α -HSD/ CR zu untersuchen und mögliche Regulationselemente wie Operatoren und Repressoren zu identifizieren. Mit Hilfe von Aktivitätsmessungen und Bandshift-Assays wurden Regionen einer definierten DNA-Sequenz geprüft. Als Ausgangssequenz wurde ein in einen „high-copy-number“-Vektor kloniertes DNA-Fragment verwendet, das Plasmid p6 mit einer Länge von 5.275 kb. Das Insert von p6 enthält die Gensequenz für die 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase (*hsdA*), die Gensequenz für ein weiteres am Steroidstoffwechsel beteiligtes Enzym (*3-ksi*) und verschiedene offene Leserahmen (*orf* 1-4), die mögliche Regulationselemente der 3 α -HSD codieren. Es wurden in vorher in der Arbeitsgruppe durchgeführten Computeranalysen von p6 zwei zueinander palindromische Sequenzen mit einer Länge von 10 Nukleotiden gefunden, die als mögliche Operatoren fungieren (OP1, OP2). Es wurden für die Aktivitätsmessung mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) verschiedene Deletionsplasmide erstellt. Nach Ergebnissen der HPLC ergaben sich Hinweise auf die Beteiligung von OP1 als Operator und einem von *orf* 4 codierten Repressorprotein. Mit Hilfe von „Electrophoretic mobility shift assays“ (EMSA) konnte gezeigt werden, dass an beide palindromische Sequenzen OP1 und OP2 eine spezifische Proteinbindung erfolgte und die Sequenzen als Operatoren der 3 α -HSD wirken. Die

zwei Operatorsequenzen befinden sich in einem Abstand von 1.633 kb. Es besteht die Vermutung, dass OP1 und OP2 einen DNA-Loop ausbilden und so zur effizienteren Repression zusammentreten. Dieser Mechanismus ist bei vielen Bakterien zu finden. Es konnte auch eine Bindung an benachbarte Sequenzen der Operatoren gefunden werden. Das gibt den Hinweis auf ein größeres Repressorprotein, da OP1 und OP2 nur jeweils 10 bp umfassen. Wie schon in der HPLC gesehen wurde, konnte mit Hilfe von EMSA eine spezifische Bindung eines von orf 4 codierten Proteins an die Operatoren der 3 α -HSD nachgewiesen werden. Die Sequenz dieses Repressorproteins (Repressor A) umfasst eine Länge von 1.263 kb. Sie codiert 420 Aminosäuren, das entspricht einem Molekulargewicht von 45.4 kDa. Für zwei weitere offene Leserahmen (orf 2, orf 3) konnte eine Bindung an chromosomale DNA von *C. testosteronei* ausgeschlossen werden. In anderen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Maser durchgeführten Arbeiten konnte ein Repressorprotein ausgehend von orf 2 gefunden werden, das seine repressorische Aktivität auf mRNA-Ebene entfaltet (Xiong et al., 2003). In weiterführenden Experimenten wurden die Repressorproteine mit Hilfe von His-tag-Säulen gereinigt und Antikörper präpariert. Als nächster Schritt ist der spezifische Bindungsnachweis von Repressor A an OP1 und OP2 mittels „Footprint-Analysen“ geplant. Durch die Aufdeckung und das Verständnis der regulatorischen Elemente des steroidmetabolisierenden Enzyms 3 α -HSD/ CR in *C. testosteronei* im Rahmen des steroidalen Abbauwegs lassen sich therapeutische Konsequenzen für Medizin und Ökologie ableiten. Zum einen könnten steroidinduzierbare Organismen gezielt gentechnisch generiert und appliziert werden, um bei Patienten mit Hypercholesterinämie einen der Hauptrisikofaktoren für Herz-Kreislaufkrankungen intestinal zu senken. Ein anderes Betätigungsfeld läge in der in situ-Reinigung kontaminierter Umwelt, z.B. der durch Steroide feminisierten Flussfauna. Aber auch der Abbau von langlebigen polychlorierten Biphenylen könnte durch den Einsatz von *C. testosteronei* forciert werden.

6 ANHANG

6.1 Literaturverzeichnis

- AHMAD, D.**, Masse, R., Sylvestre, M. (1990): Cloning and expression of genes involved in 4-chlorobiphenyl transformation by *Pseudomonas testosteroni*: homology to polychlorobiphenyl-degrading genes in other bacteria. *Gene* **86**, 53-61
- ABALAIN, J. H.**, Di Stefano, S., Amet, Y., Quemener, E., Abalain Colloc, M. L., Floch, H. H (1993): Cloning DNA sequencing and expression of (3-17) β -hydroxysteroid dehydrogenase from *Pseudomonas testosteroni*. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **44**, 133-139
- AKI, T.**, Choy, H.E., Adhya, S. (1996): Histone-like protein HU as a specific transcriptional regulator: co-factor in repression of gal-transcription by Gal-Repressor. *Gene Cells* **1**, 179-188
- BARBARO, D. J.**, Mackowiak, P. A., Barth, S .S., Southern P. M. Jr. (1987): *Pseudomonas testosteroni* infection: eighteen recent cases and a review for the literature. *Rev. Inf. Dis.* **9**, 124-9
- BAREKET-SAMISH, A.**, Cohen, I., Haran, T. E. (1997): Repressor assembly at trp binding sites is dependent on the identity of the intervening dinucleotide between the binding half sites. *J Mol Biol.* **267**, 103-17
- BARRIAULT, D.**, Sylvestre, M. (1993): Factors affecting PCB degradation by an implanted bacterial strain in soil microcosms. *Can. J. Microbiol.* **39**, 594-602
- BEN-TOVIM, T.**, Eylan, E., Romano, A., Stein, R. (1974): Gram-negative bacteria isolated from external eye infections. *Infection* **2**, 162-165
- BERGERON, J.**, Ahmad, D., Barriault, D., Larose, A., Sylvestre, M.(1994): Identification and mapping of the gene translation products involved in the first step of the *Comamonas testosteroni* B-356 biphenyl/ chlorobiphenyl biodegradation pathway. *Can. J. Microbiol.* **40**, 743-753
- BLATTNER, F. R.**, Plunkett III, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew; G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., Ying, S. (1997): The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**, 1453-1462

- BOMBA, A.**, Gancarcikova, S., Nemcova, R., Herich, R., Kastel, R., Depta, A., Demeterova, M., Ledeck, V., Zitnan, R. (1998): The effect of lactic acid bacteria on intestinal metabolism and metabolic profile in gnotobiotic pigs. *Dt. Tierärztl. Wochenschr.* **105**, 384-389
- BORTOLINI, O.**, Medici, A., Poli, S. (1997): Biotransformations on steroid nucleus of bile acids. *Steroids* **62**, 564-577
- BOYER, J.**, Baron, D. N., Talalay, P. (1965): Purification and properties of a 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase from *Pseudomonas testosteroni*. *Biochemistry* **4**, 1825-1833
- BRADFORD, M. M.** (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- BRAUN HOWLAND, E. B.**, Vesico, P.A., Nierzwicki-Bauer, S. A. (1993): Use of a simplified cell blot technique and 16S rRNA-directed probes for identification of common environmental isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3219-3224
- BUSSE, H. J.**, El-Banna, T., Oyaizu, H., Auling, G. (1992): Identification of xenobiotic-degrading isolates from the beta subclass of the Proteobacteria by a polyphasic approach including 16S rRNA partial sequencing. *Int. J., Syst. Bacteriol.* **42**, 19-26
- CARR, N. G.**, Craig, I. W. (1970): *Phytochemistry and Phylogeny* (Ed. Harborne, J. N.) Academic Press, London
- CASTAGNOLA, E.**, Tasso, L., Conte, M., Nantron, M., Berretta, A., Giacchino, R. (1994): Central venous catheter-related infection due to *Comamonas acidovorans* in a child with non-Hodgkin's lymphoma. *Clin. Infect. Dis.* **19**, 559-60
- CHENG, K. C.**, White, P. C., Qin, K. N. (1991): Molecular cloning and expression of rat liver 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase. *Mol. Endocrinol.* **5**, 823-828
- COOPER, G. M.** (2000): *The Cell: A molecular Approach*. 2nd Edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland (MA)
- COOTE, J.G.**, Hassal, H. (1973): The degradation of L-histidine, imidazol-L-lactate and imidazolpropionate by *Pseudomonas testosteroni*. *Biochem. J.* **132**, 409-422

- COSMA, M. P.**, Panizza, S., Nasmyth, K. (2001): Cdk1 triggers association of RNA polymerase to cell cycle promoters only after recruitment of the mediator by SBF. *Mol. Cell.* **7**, 1213-1220
- COULTER, A. W.**, Talaly, P. (1968): Studies on the microbiological degradation of steroid ring A. *J. Biol. Chem.* **243**, 3238-3247
- DAGLEY, S.**, Patel, M. D. (1957): Oxidation of p-cresol and related compounds by a *Pseudomonas*. *Biochem. J.* **66**, 227-233
- DAGLEY, S.**, Geary, P. J., Wood, J. M. (1968): The metabolism of protocatechoate by *Pseudomonas testosteroni*. *Biochem. J.* **109**, 559-568
- DEBEER, T.**, Fang, J., Ortega, M., Yang, Q., Maes, L., Duffy, C., Berton, N., Sippy, J., Overduin, M., Feiss, M., Catalano, C. E. (2002): Insights into specific DNA recognition during the assembly of viral genome packaging machine. *Mol. Cell* **9**, 981-991
- DESMET, I.**, DeBoever, P., Verstraete, W. (1988): Cholestrol lowering in pigs through enhanced bacterial bile salt hydrolase activity. *Br. J. Nutr.* **79**, 185-194
- DEVOS, P.**, Kersters, K., Falsen, E., Pot, B., Gillis, M., Segers, P., De Ley, J. (1985): *Comamonas* Davis and Park 1962 gen. nov., mom. Rev. Emend., and *Comamonas terrigena* Hugh 1962 sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**, 443-453
- DODDS, E. C.**, Lawson, W. (1936): Synthetic Estrogenic Agents without the Phenanthrene Nucleus. *Nature* **136**, 996
- DROBNIC, K.**, Krizaj, I., Gubensek, F., Komel, R. (1993): Improved purification of steroid 1:2-dehydrogenase from *Nocardia opaca* and partial characterization of its cloned gene sequence. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **190**, 509-515
- DUNN, T. M.**, Hahn, S., Ogden, S., Schleif, R. F. (1984): An operator at -280 base pairs that is required for repression of araBAD operon promoter: addition of DNA helical turns between the operator and promoter cyclically hinder repression. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **81**, 5017-5020
- ECHOLS, H.** (1990): Nucleoprotein structures initiating DNA replication transcription and site-specific recombination. *J. Biol. Chem.* **265**, 14697-14700
- ELTIS, L. S.**, Bolin, J.T. (1996): Evolutionary relationships among extradiol dioxygenases. *J. Bacteriol.* **178**, 5930-5937

- FRANCIS, M.,** Watanabe, M. (1979): In *Abstracts of the XIth International Congress of Biochemistry*, Toronto, July 8-13, p. 472
- FRANCIS, M.,** Watanabe, M. (1980): In Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology, Miami Beach, May 11-16, p. 146
- FRIEDMAN, A. M.** (1995): Crystal structure of *lac* repressor core tetramer and its implications for DNA looping. *Science* **268**, 1721-1727
- GALAN, B.,** Kolb, A., Sabz, J. M., Garcia, J. L., Prieto, M. A. (2003): Molecular determinants of the *hpa* regulatory system of *Escherichia coli*: the HpaR repressor. *Nucleic Acids Res.* **31**, 6598-6609
- GALARNEAULT, T. P.,** Leifson, E. (1956): Taxonomy of *Lophomonas* n. gen. *Can. J. Microbiol.* **2**, 102-110
- GARCIA-VALDES, E.,** Cozar, E., Rotger, R., Lalucat, J., Ursing, J. (1988): New naphthalene degradingmarine *Pseudomonas* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2478-2485
- GENTI RAIMONDI, S.,** Tolmasky, M. E., Patrito, L. C., Flury, A., Actis, L. A. (1991): Molecular cloning and expression of the β -hydroxysteroid dehydrogenase gene from *Pseudomonas testosteroni*. *Gene* **105**, 43-49
- GERCKEN, J.,** Sordyl, H. (2001): Effects of environmental hormones on organisms in the Baltic Sea. In : Bundesministerium für Bildung und Forschung
- GEUNS, J. M. C.** (1977): Steroid hormones and plant growth and development. *Phytochemistry* **17**, 1-14
- GIBSON, D. T.,** Wang, K. C., Sih, C. J., Whitlock, H. (1966): Mechanisms of steroid oxidation by microorganisms. IX. On the mechanism of ring A cleavage in the degradation of 9,10-seco steroids by microorganisms. *J. Biol. Chem.* **241**, 551-559
- GILARDI, G. L.,**(1971): Characterization of *Pseudomonas* species isolated from clinical specimens. *Appl. Microbiol.* **21**, 414-419
- GILARDI, G. L.,** (1985): Chapter 30, *Pseudomonas*, In: Lenette, E. H., Balows, A. Hausler, W. J., Shadomy, H. J. (ed), Manual of clinical microbiology,. *Am Soc. Microbiol.* 350-372, 4th ed., Washington D. C.
- GILBERT, W.,** Müller-Hill, B. (1966): Isolation of the *lac*-Repressor. *Proc. Nat. Aca. Sci.* **56**, 1891-1898

- GILBERT, W.**, Gralla, J., Majors, J., Maxam, A. (1975): Lactose operator sequences and the action of the *Lac*-Repressor. *Protein-ligand Interactions*. Edited by Sund, H., Blauer, G., Berlin, de Gruyter, 193-206
- GÜNES, C.**, Staacke, D., Wilcken-Bergmann, B., Müller-Hill, B. (1996): Cooperative binding of two Trp repressors to α or β centered *trp* operator. *Mol. Microbiol.* **20**, 3375-3384
- GUILETTE, L. J.**, Gross, T. S., Masson, G. R., Matter, M. M., Percival, H. F., Woodward, H. R. (1994): Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lake in Canada. *Environ. Health Perspect.* **102**, 680-688
- HARAYAMA, S.**, Rekik, M. (1989): Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. *J. Biol. Chem.* **264**, 15328-15333
- HARRIES, J. E.**, Sheahan, D. A., Jobling, S., Matthiessen, P., Neall, P., Sumpter, J. P., Tyler, T., Zaman, N. (1997): Estrogenic activities in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Env. Toxicol. Chem.* **16**, 534-542
- HEFTMANN, E.** (1987): Function of steroids in plants. *Phytochemistry* **14**, 891-901
- HOGAN, M. D.**, Newbold, R. R., McLachlan, J. A. (1987): Extrapolation of teratogenic responses observed in laboratory animal to humans: DES as an illustrative example. In: *Developmental Toxicology. Mechanisms and Risks*. Banbury Report, 26, Cold Spring Habor Laboratory, 257-269
- HOLLENDER, J.**, Dott, W., Hopp, J. (1994): Regulation of chloro- and methylphenol degradation in *Comamonas testosteroni* JH5. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2330-2338
- HOLT, J. G.**, Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T. (1994): Bergey's manual of determinative bacteriology (Ed. Hensyl, W. R.), Williams & Wilkins Baltimore
- HOROWITZ, M. E.**, Pizzo, P. A. (1990): Cancer in the child infected with human immunodeficiency virus, *J. Pediatr.* **116**, 735-738
- HUET, F.**, Ruiz, C., Richards, G. (1993): Puffs and PCR: the in vivo dynamics of early gene expression during ecdysone responses in *Drosophila*, *Development* **118**, 613-627

- IRANI, M.**, Orosz, L., Adhya, S. (1983): A control element within a structural gene: the gal operon of *Escherichia coli*. *Cell* **32**, 783-788
- JACOB, F.**, Monod, J. (1961): Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* **3**, 318-356
- JIANMING, L.**, Nagpal, P., Vitart, V., McMorris, T. C., Chory, J. (1996): A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. *Science* **272**, 398-401
- JOBLING, S.**, Nolan, M., Tyler, C. R., Brighty, G. Sumpter, J. P., (1998): Widespread sexual disruption in wild fish. *Env. Sci. Tec.* **32**, 1549-1558
- JOSÉ, V.**, G. M., Leibler, S. (2003): DNA Looping and Physical Constraints on Transcription Regulation. *JBC* **331**(5), 981-989
- KANNENBERG, E. L.**, Perzl, M., Müller, P., Härtner, T., Poralla, K. (1996): Hopanoids lipids in *Bradyrhizobium* and other plant-associated bacteria and cloning of the *Bradyrhizobium japonicum* squal-hopene cyclase gene. *Plant and Soil* **186**, 107-112
- KALLIPOLITIS, B. H.**, Norregard-Madson, M., Valentin-Hansen, P. (1997): Protein-protein communication: a structural model of repression complex formed by CytR and the global regulator CRP. *Cell* **89**, 1101-1109
- KAR, S.**, Adhya, S. (2001): Recruitment of HU by piggyback: a special role of GilR in repressosome assembly. *Genes Dev.* **15**, 2273-2281
- KIMSEY, H. H.**, Waldor, M. K. (2003): The CTXphi repressor RstR binds DNA cooperatively to form tetrameric repressor:operator complexes. *J. Biol. Chem.* **279**, 2640-2647
- KINOUCHI, T.**, Kataoka, K., Miyanishi, K., Akimoto, S., Ohnishi, Y. (1993): Biological activities of the intestinal microflora in mice treated with antibiotics or untreated and the effects of the microflora on absorption and metabolic activation of orally administered glutathione conjugates of K-region epoxides of 1-nitropyrene. *Carcinogenesis* **14**, 869-874
- KRAMER, H.**, Niemoller, M., Amouyal, M., Revet, B., von Wilcken-Bergmann, B., Müller-Hill, B. (1987): Lac repressor forms loops with linear DNA carrying two suitable placed *lac* operators. *EMBO J.* **6**, 1481-1491

- LEFEBVRE, Y.A.**, Po, L., Watanabe, M. (1976): The involvement of the electron transport chain in uptake of testosterone by membrane vesicles of *Pseudomonas testosteroni*. *J. Steroid. Biochem.* **7**, 867-868
- LEFEBVRE, Y.A.**, Po, L., Watanabe, M. (1976): Effect of sulfhydryl and disulfide agents on 3 β and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase and on the steroid uptake of *Pseudomonas testosteroni*. *J. Steroid. Biochem.* **7**, 535-538
- LEFEBVRE, Y.**, Lefebvre, D. D., Schultz, R., Groman, E. V., Watanabe, M. (1979 a): The effects of specific inhibitors and an antiserum of 3 β and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase on steroid uptake in *Pseudomonas testosteroni*. *J. Steroid. Biochem.* **10**, 519-522
- LEFEBVRE, Y.**, Schultz, R., Gromas, E. V., Watanabe, M. (1979 b): Localization of 3 β and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in *Pseudomonas testosteroni*. *J. Steroid. Biochem.* **10**, 523-528
- LEMOAL, G.**, Paccalin, M., Breux, J. P., Roblot, F., Roblot, P., Becq-Giraudon, B. (2001): Central venous catheter-related infection due to *Comamonas testosteroni* in a woman with breast cancer. *Scand. J. Infect. Dis.* **33**, 627-628
- LEPPIK, R. A.** (1989): Steroid catechol degradation: Disecoandrostane intermediates accumulate by *Pseudomonas* transposon mutant strains. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 1979-1988
- LEPPIK, R. A.**, Sinden, D. J. (1987): *Pseudomonas* mutant strains that accumulate androstane and seco-androstane intermediates from bile acids. *Biochem. J.* **243**, 15-21
- LEVY, H. R.**, Talalay, P. (1959): Bacterial oxidation of steroids II. Studies on the enzymatic mechanism of ring A dehydrogenation. *J. Biol. Chem.* **234**, 2014-2021
- LEWIS, D. E. A.**, Geanakopulos, M., Adhya, S. (1999): Roles of HU and DNA supercoiling in transcription repression specialized nucleoprotein repression complex at *gal* promoters in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **31**, 451-462
- LEWIS, M.**, Chang, G., Horton, N. C., Kercher, M. A., Pace, H. C., Schumacher, M. A., Brennan, R. G., Lu, P. (1996): Crystal structure of the lactose operon repressor and its complexes with DNA and inducer. *Science* **271** (5253), 1247-54

- LOCHER, H. H.**, Leisinger, T., Cook, A. M. (1989): Degradation of *p*-toluenesulphonic acid via sidechain oxidation, desulphonation and *meta*-ring cleavage in *Pseudomonas (Comamonas) testosteroni* T-2. *J. Gen. Microbiol* **135**, 1969-1978
- MACDONALD, I. A.**, Meier, E. C., Mahony, D. E., Costain, G. A. (1979): 3 α -, 7 α - and 12 α - hydroxysteroid dehydrogenases activities from *Clostridium perfringens*. *Biochim. Biophys. Acta* **450**, 142-153
- MACDONALD, I. A.**, Jellet, J. F., Mahony, D. E., Holdeman, L. V. (1979): Bile salt 3 α - and 12 α -hydroxysteroid dehydrogenase from *Eubacterium lentum* and related organisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 992-10000
- MACKENZIE, A. S.**, Brassel, S. C., Eglinton, G., Maxwell, J. R. (1982): Chemical Fossils: The Geological Fate of Steroids. *Science* **217**, 491-504
- MADIGAN, M.T.**, Martinko, J. M., Parker, J. (1997): Brock biology of microorganisms, Prentice-Hall International, London
- MALLONEE, D. H.**, Lijewski, M. A., Hylemon, P. B. (1995): Expression in *Escherichia coli* and characterization of a bile acid-inducible 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase from *Eubacterium* sp. strain VPI 12708. *Curr. Microbiol.* **30**, 259-263
- MARCUS, P. I.**, Talalay, P. (1956): Induction and purification of α - and β -hydroxysteroid dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* **218**, 2009-2013
- MASER, E.**, Oppermann, U. C. T., Bannenberg, G., Netter, K. J. (1992): Functional and immunological relationships between metyrapone reductase from mouse liver microsomes and 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase from *Pseudomonas testosteroni*. *FEBS Lett.* **297**, 196-200
- MASER, E.**, Möbus, E., Xiong, G. (2000): Functional expression, purification and characterization of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase/ carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **272**, 622-628
- MILLER, J.**, Reznikoff, W. (1978): The Operon, Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- MÖBUS, E.**, Jahn, M., Schmid, R., Jahn, D., Maser, E. (1997): Testosterone-regulated expression of enzymes involved in steroid and aromatic hydrocarbon catabolism in *Comamonas testosteroni*. *J. Bacteriol.* **179**, 5951-5955

- MÖBUS, E.**, Maser, E. (1998): Molecular cloning, overexpression and characterization of steroid inducible 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase/ carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*. A novel member of the short-chain dehydrogenase/ reductase superfamily. *J. Biol. Chem.* **273**, 30888-30896
- MOLNÁR, I.**, Choi, K. P., Yamashita, M., Murooka, Y. (1995): Molecular cloning, expression, in *Streptomyces lividans*, and analysis of a gene cluster from *Arthrobacter simplex* encoding 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase, 3-ketosteroid- Δ^5 -isomerase and a hypothetical regulatory protein. *Mol. Microbiol.* **15**, 895-905
- MÜLLER-HILL, B.** (1983): Sequence homology between Lac and Gal repressors and three sugar-binding periplasmatic proteins. *Nature* **302**, 163-164
- MÜLLER-HILL, B.** (1998): Some repressors of bacterial transcription. *Curr. Op. Microbiol.* **1**, 145-151
- NAIR, T. M.**, Kulkarni, B. D. (1994): on the consensus structure within the *E. coli* promoters. *Biophys. Chem.* **48**, 383-393
- NASH, H. A.** (1996): The *E. coli* HU and IHF proteins; accessory factors for complex protein-DNA assemblies. In Lin, E. C. C. and Lynch, A. S. (eds), Regulation of gene Expression in *E. coli*. R.G. Landes Company, Georgetown, TX, pp. 149-179
- OEHLMANN, J.**, Ide, I. Bauer, B. Watermann, B., Schulte-Oehlmann, U. Liebe, S., Fioroni, P. (1996): Erfassung morphologischer- und histopathologischer Effekte von Organozinnverbindungen auf marine Mollusken und Prüfung ihrer Verwendbarkeit für ein zukünftiges biologisches Effektmonitoring. *Umweltforschungsplan des Umweltbundesamtes*, Forschungsbericht 10240303/01
- OPPERMANN, U.C.T.**, Maser, E. (1996): Characterization of a 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase/ carbonyl reductase from the Gram-negative bacterium *Comamonas testosteroni*. *Eur. J. Biochem.* **241**, 744-749
- OPPERMANN, U. C. T.**, Belai, I., Maser, E. (1996): Antibiotic resistance and enhanced insecticide catabolism as consequences of steroid induction in the Gram-negative bacterium *Comamonas testosteroni*. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **58**, 217-223.

- OURISSON, G.**, Rohmer, M., Poralla, K. (1987): Procaryotic hopanoids and other sterol surrogates. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**, 301-333
- PAWLOWSKI, J. E.**, Huizinga, M., Penning, T.M. (1991): Cloning and sequencing of the cDNA for rat liver 3 alpha-hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase. *J Biol Chem.*, **266**, 8820-8825
- PETTIGREW, C. A.**, Breen., A., Corcoran, C., Cayler, G. S. (1990): Chlorinated biphenyl mineralization by individual populations and consortia of freshwater bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2036-2045
- PLESIAT, P.**, Nikaido, H. (1992): Outer membranes of Gram-negative bacteria are permeable to steroid probes. *Mol. Microbiol.* **6**, 1323-1333
- PLESIAT, P.**, Grandguillot, M., Harayama, S., Vragar, S., Michel-Briand, Y. (1991): Cloning, sequencing and expression of the *Pseudomonas testosteroni* gene encoding 3-oxosteroid delta 1-dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **173**, 7219-7227
- PRIDMORE, R. D.** (1987): New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker. *Gene* **56**, 309-312
- PTASHNE, M.** (1992): A Genetic Switch, Phage λ and Higher Organisms, 2nd ed. Cambridge, MA, Cell Press, Blackwell Scientific Publications.
- PURDOM, C. E.**, Hardiman, P. H., Bye, V. J., Eno, N. C., Tyler, C. R., Sumpter J. P. (1994): Estrogenic Effects of Effluents from Sewage Treatment Works. *Chemistry and Ecology* **8**, 275
- RAUMANN, B. E.**, Rould, M. A., Pabo, C. O., Sauer, R. T. (1994): DNA recognition by beta-sheets in the Arc repressor-operator crystal structure. *Nature* **367**, 754-757
- REDMOND, J. W.**, Batley, M., Djordjevic, M. A., Innes, R. W., Kuempel, P. L., Rolfe, B. G. (1986): Flavones induce expression of nodulation gene in *Rhizobium*. *Nature* **323**, 632-635
- ROWLAND, S.S.**, Falker, W.A. Bashirelahi, N. (1992): Identification of estrogen-binding protein in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Steroid. Biochem Molec. Biol.* **42**, 721-727
- RUSSEL, D. W.** (1996): Green light for steroid hormones. *Science* **272**, 370-371
- SANTERO, E.**, Hoover, T. R., Noth, A. K., Berger, D. K., Porter, S. C., Kustu, S. (1992): Role of integration host factor in stimulating transcription from the $\delta 54$ -dependent nifH promoter. *J. Mol. Biol.*, **227**, 602-620

- SAMBROOK, J.**, Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989): Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York
- SCHLEIF, R.** (1992): DNA looping. *Annu Rev Biochem.* **61**, 199-223
- SCHUBERT, K.**, Böhme, K. H., Ritter, F., Hörhold, C. (1968): Mikrobieller Abbau von Progesteron zu α -Ketoglutarinsäure und Bernsteinsäure. *Biochim. Biophys. Acta* **152**, 401-408
- SCHUBERT, K.**, Rose, G., Tümmler, R., Ikekawa, N. (1964): Sterine in Escherichia coli. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **339**, 293-296
- SEMSEY, S.**, Geanakopoulou, M., Dale, L., Adhya, S. (2002): Operator-bound GalR dimers close DNA loops by direct interaction: tetramerization and inducer binding. *EMBO J.* **21**, 4349-4356
- SHARPE, R.**, Skakkebaek, N. E. (1993): Are Oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract. *Lancet* **341**, 1392-1395
- SHIKITA, M.**, Talalay, P. (1979): Preparation of highly purified 3 α - and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenases from *Pseudomonas sp.* *Anal Biochem.* **95**, 286-292
- SKAKKEBAEK, N. E.** (2001): The Oestrogen Hypothesis 8 years later. In: Bundesministerium für Bildung und Forschung
- SLIJPER, M.**, Bonvin, A. M. J. J., Boelens, R., Kaptein, R. (1996): Refined structure of *lac* repressor headpiece (1-56) determined by relaxation matrix calculations from 2D and 3D NOE data: change of tertiary structure upon binding to the *lac* operator. *J. Mol. Biol.* **259**, 761-773
- SONDOSSI, M.**, Sylvestre, M., Ahmad, D. (1992): Effects of chlorobenzoate transformation on the *Pseudomonas testosteroni* biphenyl and chlorobiphenyl pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 485-95
- SONNENWIRTH, A. C.** (1970): Bacteremia with and without meningitis due to *Yersinia enterocolitica*, *Edwardsiella tarda*, *Comamonas terrigena*, and *Pseudomonas maltophilia*. *Ann N. Y., Acad. Sci.* **174**, 488-502
- SOUTHERN, P.J.**, Berg, P. (1982): Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Genet.* **1**, 327-341

- SOUTHERN, E. M.** (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol Biol.* **98**, 503-517
- STACKEBRANDT, E.**, Murray, R.G. E., Trüper, H. G. (1988): *Proteobacteria* classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the “purple bacteria and their relatives”. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**, 321-325
- STOLZ, A.**, Rahimi-Kiani, M., Ameis, D., Chan, E., Ronk, M., Shively, J.E. (1991): Molecular structure of rat hepatic 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase. A member of the oxidoreductase gene family. *J. Biol. Chem.* **266**, 15253-15257
- STONECIPHER, K. G.**, Jemsen, H. G., Kastl, P. R., Faulkner, A., Rowsey, J. J. (1991): Ocular infections associated with *Comonas acidovorans*. *Am. J. Ophthalmol.* **112**, 46-49
- SU, W.**, Porter, S., Kustu, S. and Echols H. (1990): DNA-Looping and enhancer activity, association between DNA-bound NtrC activator and RNA polymerase at the bacterial *glnA* promotor. *Proc. Natl., Acad. Sci. USA.* **87**, 5504-5508
- SUZUKI, K.**, Ueda, S., Sugiyama, M., Imamura; S. (1993): Cloning and expression of a *Pseudomonas* 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase-encoding gene in *Escherichia coli*. *Gene* **130**, 137-140
- TALALAY; P.**, Wang, V. (1955): Enzymatic isomerisation of Δ^5 -3-ketosteroids. *Biochim. Biophys. Acta* **18**, 300-301
- TALALAY, P.**, Dobson, M. M., Tapley, D. E. (1952): Oxidative degradation of testosterone by adaptive enzymes. *Nature* **170**, 620-621
- TAMAOKA, J.**, Ha, D. M., Komagata, K. (1987): Reclassification of *Pseudomonas acidovorans* den Dooren de Jong 1926 and *Pseudomonas testosteroni* Marcus and Talalay 1956 as *Comamonas acidovorans* comb. nov. and *Comamonas testosteroni* comb nov. with an emended description of the genus *Comamonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**, 52-59
- THOMAS, J. O.**, Tarvers, A. A. (2001): HMG1 and 2 related “architectural” DNA-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 167-174
- TRÄGER, L.** (1977): Steroidhormone, Springer Verlag, Berlin
- UWAJIMA, T.**, Takayama, K., Terada, O. (1978): Production, purification and crystallization of 3 α - hydroxysteroid dehydrogenase of *Pseudomonas putida*. *Agric. Biol.* **42**, 1577-1583

- VAN LIMBERGEN, H.**, Top, E. M., Verstraete, W. (1998): Bioaugmentation in activated sludge: current features and future perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 16-23
- VISCHER, E.**, Wettstein, A. (1958): Enzymatic transformations of steroids by microorganisms. *Adv. Enzymol.* **20**, 237-282
- WANG, K. C.**, Sih, C. J. (1963): Mechanisms of steroid oxidation by microorganisms, IV. Seco intermediates. *Biochemistry* **2**, 1238-1243
- WACKER, A.**, Drews, J., Pratt, W. B., Laurent, H., Petzoldt, K. (1965): Enzyminduktion mit Steroiden bei *Pseudomonas testosteroni*. *Z. Naturforschg.* **20b**, 547-553
- WASSEM, R.**, deSose, E. M., Yates, M. G., Pedrosa, F. D., Buck, M. (2000): Two roles for integration host factor at an enhancer-dependent nifA promotor. *Mol. Microbiol.* **35**, 756-764
- WATANABE, M.**, Phillips, K., Watanabe H. (1973): Induction of steroid-binding activity in *Pseudomonas testosteroni*. *J. Steroid. Biochem.* **4**, 623-632
- WATANABE, M.**, Watanabe, H. (1974): Periplasmatic steroid-binding proteins and transformation enzymes of *Pseudomonas testosteroni*. *J. Steroid. Biochem.* **5**, 439-446
- WATANABE, M.**, Po L. (1974): Testosterone uptake by membrane vesicles of *Pseudomonas testosteroni*. *Biochim. Biophys. Acta* **345**, 419-429
- WATANABE, M.**, Po, L., Hunt, D., Lefebvre, Y. (1979): Binding of steroids by a partially purified periplasmatic protein from *Pseudomonas testosteroni*. *J. Steroid Biochem.* **10**, 207-213
- WATANABE, M.**, Po, L. (1976): Membrane bound 3 β and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase and its role in steroid transport in membrane vesicles of *Pseudomonas testosteroni*. *J. Steroid Biochem.* **7**, 171-175
- WEIKERT, M. J.**, Adhya, S. (1992): A family of bacterial regulators homologous to Gal and Lac repressors. *J. Biol. Chem.* **267**, 15869-15874
- WETTERMARK, M. H.**, Taylor, J. R., Rogers, M. L., Heath, H. E. (1979): Metabolism of carbohydrate derivatives by *Pseudomonas acidovorans*. *J. Bacteriol* **138**, 418-424
- WILLEMS, A.**, de Vos, P, de Ley, J. (1992): The genus Comamonas. In: The procaroytes, a handbook on the biology of bacteria, ecophysiology, isolation,

- identification and applications. (Ed. Balows, A., Trueper, H. G. and Dworkin, M.) Springer Verlag, Berlin
- XIONG, G.,** Maser, E. (2001): Regulation of the Steroid-inducible 3 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase/ Carbonyl Reductase Gene in *Comamonas testosteroni*. *J. Biol Chem.* **276**, 9961-9970
- XIONG, G.,** Martin, H.-J., Blum, A., Schäfers, C., Maser, E. (2001): A model on the regulation of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase/ carbonyl reductase expression in *Comamonas testosteroni*. *Chem. Biol. Interact.* **130-132**, 723-736
- XIONG, G.,** Martin, H. J., Maser, E. (2003): Identification and characterization of a novel translational repressor of the steroid-inducible 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase/ carbonyl reductase gene in *Comamonas testosteroni*. *J. Biol. Chem.* **278**, 47400-47407
- XIONG, G.,** Markowetz, S., Maser, E. (2003): Regulation of 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase/ carbonyl reductase in *Comamonas testosteroni*: function and relationship of two operators. *Chem. Biol. Interact.* **143-144**, 411-23
- YANG, J.,** Gunasekera, A., Lavoie, T. A., Jin, L., Lewis, D. E., Carey, J. (1996): In vivo and in vitro studies of Trp-R-DNA interactions. *J. Mol. Biol.* **258**, 37-52
- YANISCH-PERRON, C.,** Vieira, J. And Messing, J. (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119
- YOSHINAGA, S.,** K., L'Etoile, N. D., Berl A. J. (1989): Purification and characterization of transcription factor IIC2. *J. Biol. Chem.* **264**, 10726-10731

6.2 Abkürzungsverzeichnis

3 α -HSD	3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
3- <i>ksi</i>	Gensequenz der 3-Ketosteroidisomerase
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C. test.	Comamonas testosteroni
CSPD	3-(4-Methoxyspiro{ 1,2-dioxetan-3,2`-(5`-chloro)tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}] decan}-4-yl)-Phenylphosphat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	Doppelstrang-DNA
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
EtOH	Ethanol
HPLC	Hochleistungschromatographie(„high performance liquid chromatography“)
<i>hsdA</i>	Gensequenz der 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
nt	Nukleotide
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
Orf	„open reading frame“, offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS-Puffer	Phosphat, NaCl-Puffer
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
Rpm	Umdrehungen pro Minute („rotations per minute“)

SAP	Shrimp Alkalische Phosphatase
SDS	Natrium(sodium)dodecylsulfat
SM	Natrium(sodium)chlorid-Magnesiumchlorid
SSC	Natrium(sodium)chlorid-Natrium(sodium)citrat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
U	Unit(s)
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht (weight) pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

6.3 Publikationen

Folgende Originalarbeiten sowie Kongressbeiträge wurden veröffentlicht:

A) Originalpublikationen:

Xiong G, Martin H-J, Blum A, Schäfers C, Maser E (2001): A Model on the Regulation of 3 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase/ Carbonyl Reductase Expression in *Comamonas testosteroni*. *Chemico-Biological Interactions* 130-132 (2001) 723-736

B) Kongressbeiträge/ Abstracts

1. Schäfers C, Xiong G, Maser E (1999): The Repressor and Operator Interaction during 3 α -HSD gene Expression in *Comamonas testosteroni*., Mechanismen der Genregulation in Mikroorganismen, 25-28. November 1999, Kloster Ohrbeck bei Osnabrück
2. Poster s.o., gemeinsamer Kongress der DGHM, ÖGHMP und VAAM, Microbiology 2000, 12. -16. März 2000, München

Im Rahmen einer Tätigkeit als studentische Mitarbeiterin im kardiologisch-immunologischen Labor des Zentrums für Innere Medizin der Universität Marburg:

3. Portig I, Kliebe F, Schäfers C, Seifert C, Wolf M, Pankuweit S, Richter A, Ruppert V, Maisch B (2000): Hsp70 Polymorphismen bei inflammatorischer Herzerkrankung, Deutscher Kardiologen-Kongress, Mannheim, 2000

6.4 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Christina Schäfers
Geburtsdatum: 13. Mai 1976
Geburtsort: Paderborn
Familienstand: ledig

Schulbildung

1982- 1986 Comenius-Grundschule Paderborn/Elsen
1986- 1995 Goerdeler-Gymnasium Paderborn mit Abschluss Abitur

Hochschulbildung

10/1995- 10/2002 Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg

Wissenschaftliche Arbeiten

Seit 01/1999 Ausarbeitung einer Dissertation am Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Marburg bei Prof. Dr. E. Maser
01/00- 12/00 wissenschaftliche Mitarbeiterin im kardiologisch- immunologischen Labor des Zentrums für Innere Medizin, Universität Marburg bei Prof. Dr. B. Maisch

Ärztliche Tätigkeit

02/2003-08/2004 Ärztin im Praktikum in der Frauenklinik des Klinikums Landshut
seit 09/2004 Assistenzärztin im Zentrum für Geburtshilfe und Frauenheilkunde des Universitätsklinikums Bonn

6.5 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

in Marburg

Adamkiewicz, Alfke, Arnold, Aumüller, Baake, Barth, Basler, Battmann, Baum, Beato, Becker, Bertalanffy, Bette, Bien, Bierbrauer, Bolm, Brandt, Brilla, Cetin, Czubayko, Daut, Doll, Doss, Ebel, Effendy, Eissele, Feddersen, Feuser, Fick, Fruhstorfer, Fuchs, Garn, Geks, Gerst, Gamsa, Geus, Goerke, Görg, Gotthardt, Gotzen, Griss, Gröne, Happle, Hartmann, Hasilik, Heeg, Herzum, Hesse, Heufelder, Höffken, Hofmann, Joseph, Jungclas, Junge, Kaiser, Katschinski, Kern, Kleene, Klenk, Klose, Koch, Köhler, Koolman, Kraft, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroh, Kroll, Kropf, Kuhn, Lammel, Lang, Lange, Lemke, Lennartz, Leppek, Lippert, Löffler, Maisch, Maser, McGregor, Meinhardt, Mennel, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Noll, Oertel, Peter, Petermann, Podszus, Printz, Ramaswamy, Reichardt, Remschmidt, Renneberg, Renz, Richter, Röhm, Rosenow, Rothmund, Schachtschabel, Schädel, Höpfner, Schäfer, Schlegel, Schmidt, Schnabel, Schneider, Schneyer, Schuermann, Schüffel, Schulz, Schurek, Schwarz, Seitz, Sekundo, Seyberth, Slenczka, Sommer, Sprenger, Steininger, Steinmetz, Ullmann, Vohland, Voigt, von Garrel, von Wichert, Wagner, Walland, Walthers, Weihe, Wellstein, Werner, Westermann, Westphal, Wilke, Wolf, Wulff, Ziegler

in Nizza/ Frankreich

Fuzibet, Cua, Kaphan

In Chur/ Schweiz

Leutenegger, Furrer, Sommer

6.6 Danksagung

Herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. E. Maser für die Überlassung des Themas, für die stetige Bereitschaft zu Diskussion und Gespräch und für die Unterstützung während der ganzen Promotion.

Für die Einführung in die Gebiete der Molekularbiologie und Mikrobiologie, die unermüdliche, fachlich kompetente Betreuung sowie einige fernöstliche Weisheiten möchte ich mich besonders bei Dr. G. Xiong bedanken.

Außerdem möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie danken. Die freundliche Arbeitsatmosphäre und bereitwillige Hilfestellung bei kleineren und größeren Problemen haben dazu beigetragen, dass ich mich an meine Zeit im Labor gerne erinnere.

Hans-Jörg Martin und Bernhard Völker bin ich sehr dankbar, weil sie mir bei Computerfragen stets zur Seite standen und Jutta Friebertshäuser für ihre Hilfe bei den HPLC-Messungen.

Besonders danken möchte ich Frank für seine Geduld, sein Verständnis und seine liebevolle Unterstützung, nicht nur während dieser Arbeit.

Der größte Dank allerdings gebührt meinen Eltern, die mich durch ihre Liebe und durch ihre engagierte Erziehung auf das Erwachsensein vorbereitet haben, und deren Unterstützung und Rat in allen Belangen mir stets sehr viel bedeutet haben und bedeuten werden.

6.7 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Identifizierung von cis- und trans-regulatorischen Elementen der 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase/ Carbonylreduktase-Expression in *Comamonas testosteroni*“ im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Philipps-Universität unter Leitung von Herrn Prof. Dr. E. Maser ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt habe und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch zur Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Bonn, 1. November 2004

Christina Schäfers

